

Aus der Kinderchirurgischen Klinik und Poliklinik
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dietrich von Schweinitz

Identifizierung epigenetisch regulierter Gene beim Rhabdomyosarkom

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Sebastian Wolf
aus
Tegernsee
2013

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. Roland Kappler
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Peter B. Becker Prof. Dr. Heiko Hermeking Prof. Dr. Hans-Joachim Stemmler
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	31.01.2013

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	RHABDOMYOSARKOM.....	1
1.2	EPIGENETISCHE GENREGULATION.....	4
1.3	DER BMP – SIGNALWEG.....	7
2	AUFGABENSTELLUNG.....	10
3	MATERIALIEN.....	11
3.1	ZELLINIEN.....	11
3.2	ZELLMEDIEN.....	11
3.3	ANTIBIOTIKA.....	12
3.4	ENZYME.....	12
3.5	PLASMIDE.....	12
3.6	GRÖßENSTANDARDS.....	13
3.7	PRIMER.....	13
3.8	REKOMBINANTE PROTEINE.....	17
3.9	CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN.....	17
3.10	PUFFER.....	18
3.11	KITS.....	18
3.12	VERBRAUCHSMATERIAL.....	18
3.13	GERÄTE.....	19
4	METHODEN.....	21
4.1	EPIGENETISCHE METHODEN.....	21
4.1.1	<i>In vitro de novo Methylierung.....</i>	<i>21</i>
4.1.2	<i>Bisulfitkonvertierung.....</i>	<i>21</i>
4.1.3	<i>Methylierungsspezifische PCR.....</i>	<i>22</i>
4.1.4	<i>Bisulfitsequenzierung.....</i>	<i>23</i>
4.2	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	25
4.2.1	<i>Kultivieren eukaryotischer Zellen.....</i>	<i>25</i>
4.2.2	<i>Passagieren eukaryotischer Zellen.....</i>	<i>25</i>
4.2.3	<i>Kryokonservierung eukaryotischer Zellen.....</i>	<i>25</i>
4.2.4	<i>Behandlung mit 5-Aza-2'-deoxycytidin.....</i>	<i>25</i>
4.2.5	<i>Transiente Transfektion.....</i>	<i>26</i>
4.2.5.1	<i>Elektroporation.....</i>	<i>26</i>

4.2.5.2 Lipofektion	26
4.2.6 <i>Behandlung mit rekombinantem BMP2</i>	27
4.2.7 <i>Proliferationsassay</i>	27
4.2.8 <i>Annexin-V-Calcein-Assay</i>	28
4.3 MOLEKULARGENETISCHE METHODEN	29
4.3.1 <i>DNA-Isolation aus adhärenenten Zellen und Gewebe</i>	29
4.3.2 <i>DNA-Isolierung aus humanem Blut</i>	29
4.3.3 <i>RNA-Isolation aus adhärenenten Zellen und Gewebe</i>	30
4.3.4 <i>cDNA-Synthese</i>	31
4.3.5 <i>Quantitative real-time PCR</i>	31
4.3.6 <i>Klonierung</i>	32
4.3.6.1 TA-Klonierung	32
4.3.6.2 Klonierung in Expressionsplasmide	33
4.3.7 <i>Transformation von Ligationsansätzen in E.coli</i>	33
4.3.8 <i>Blau-Weiß-Selektion</i>	34
4.3.9 <i>Präparation von Plasmid-DNA</i>	34
4.3.10 <i>Restriktionsverdau</i>	35
4.3.10.1 EcoRI-Restriktionsverdau	35
4.3.10.2 Sma I – Restriktionsverdau	36
4.3.10.3 Sma I/Hind III – Restriktionsverdau	36
4.3.11 <i>Ortsspezifische in-vitro Mutagenese</i>	37
4.3.12 <i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	37
4.3.13 <i>Agarose-Gelextraktion</i>	38
5 ERGEBNISSE	39
5.1 IDENTIFIZIERUNG EPIGENETISCH REGULierter GENE DES RMS	39
5.2 REAKTIVIERUNG VON BMP2 UND RASSF1A DURCH DEMETHYLIERUNG	41
5.3 NACHWEIS VON BMP2 UND DESSEN REZEPTOREN	43
5.4 BESTIMMUNG DES METHYLIERUNGSSTATUS VON BMP2	44
5.4.1 <i>Methylierungsanalyse mittels Bisulfitsequenzierung</i>	44
5.4.2 <i>Methylierungsanalyse mittels methylspezifischer PCR</i>	46
5.4.3 <i>Analyse der Transkriptionsfaktor-Bindestellen im BMP2-CpG-Island</i>	48
5.5 REAKTIVIERUNG VON BMP2	49
5.5.1 <i>Herstellung eines BMP2 - Expressionsplasmides</i>	49
5.5.2 <i>Etablierung einer geeigneten Transfektionsmethode für RMS</i>	49
5.5.3 <i>Auswirkungen einer BMP2 - Reaktivierung auf die Zellproliferation</i>	52
5.5.4 <i>Auswirkung einer BMP2-Reaktivierung auf das Apoptoseverhalten</i>	54

5.5.5	<i>Auswirkung einer BMP2-Reaktivierung auf die Zielgenexpression</i>	<i>56</i>
6	DISKUSSION	61
6.1	EXPRESSIONS- UND METHYLIERUNGSANALYSE IN RMS-ZELLINIEN.....	61
6.2	REAKTIVIERUNG VON BMP2 IN RMS ZELLINIEN	66
6.3	MÖGLICHE AUSWIRKUNGEN DIESER ERGEBNISSE AUF EINE VERBESSERUNG DER THERAPIE DES RMS UND ZUSAMMENHANG MIT ANDEREN SIGNALWEGEN	71
7	ZUSAMMENFASSUNG	74
8	LITERATURVERZEICHNIS	75
9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	84
10	WISSENSCHAFTLICHE BEITRÄGE	87
10.1	TAGUNGSBEITRÄGE	87
10.2	PUBLIKATIONEN.....	87
11	DANKSAGUNG.....	88

1 Einleitung

Tumorerkrankungen stellen die zweithäufigste Todesursache bei Kindern in den Industrieländern dar [1]. Obwohl in den letzten Jahren eine ganze Reihe neuer Mechanismen der Tumorentstehung entdeckt worden sind, steht man erst am Anfang des Verstehens dieser malignen Erkrankungen. Genetische Veränderungen stellen entscheidende Faktoren sowohl für die Auslösung als auch die Aufrechterhaltung des Tumorwachstums dar [2]. Darüber hinaus werden epigenetische Veränderungen in Form von DNA-Methylierungen von Tumorsuppressorgenen, die zu deren transkriptionellen Unterdrückung führen, als ein bedeutendes Element in der Entstehung von Tumorerkrankungen diskutiert [3]. Auch beim Rhabdomyosarkom, dem häufigsten Weichteilsarkom beim Kind, sind vereinzelte genetische und epigenetischen Alterationen bekannt [4].

Über die letzten Jahre mehrten sich Hinweise, dass das Ausschalten von Genen, die wichtig für die Entwicklung unterschiedlichster Organe sind, eine bedeutende Rolle in der Tumorgenese einnimmt [5]. Hierzu zählt beispielsweise der Wachstumsfaktor BMP2 (bone morphogenetic protein 2).

1.1 Rhabdomyosarkom

Mit annähernd 7% verkörpern Weichteiltumoren einen nicht zu vernachlässigenden Anteil aller Malignomerkrankungen im Kindes- und Jugendalter [1]. Das Rhabdomyosarkom (RMS) dominiert diese Gruppe mit über der Hälfte aller Fälle und stellt daher mit einer jährlichen Inzidenz von 4-7 Fällen pro einer Million Kinder das häufigste Weichteilsarkom in diesem Lebensabschnitt dar [6, 7]. Die RMS-Neuerkrankungsrate ist im Alter von ein bis vier Jahren am höchsten, fällt langsam auf eine niedrigere Rate zwischen 10-14 Jahren ab und erreicht mit einem Lebensalter von 15-19 Jahren ein konstantes Level [8].

Seinen Ursprung findet das RMS in embryonalem, mesenchymalem Gewebe, welches die Fähigkeit hat, sich in quergestreiften Muskel zu differenzieren [9]. Da dieses Gewebe überall im menschlichen Körper verbreitet ist, kann das RMS auch an den verschiedensten Stellen entstehen. Am häufigsten tritt das RMS in der Kopf- und Nackenregion auf, wobei hier 16% parameningeal, 9% in der Orbita und 10% an anderen Bereichen lokalisiert sind. Des Weiteren entstehen diese Tumoren bevorzugt im Urogenitaltrakt (24%) und den Extremitäten (19%). 22% verteilen sich schließlich auf diverse andere Regionen des Körpers [10-12]. Klinisch apparent wird das RMS oft erst durch eine schmerzlose Schwellung (meist bei Tumoren der Extremitäten oder Kopf-/Nackenregion), es kann aber auch, je nach Lokalisation des Tumorherdes, eine Fülle an Symptomen generieren. So gehen RMS der Blase und des Urogenitaltraktes oft mit Hämaturie und Pollakisurie, der Orbitaregion mit

Exophthalmus und Ophthalmoplegie und bei parameningealer Ausprägung mit einer Obstruktion der Sinus, des Gehörkanals oder der Nasenräume und kraniellen Problemen einher [9]. Eine Metastasierung geschieht vorwiegend über lymphogene Wege, vor allem bei Tumoren der Extremitäten, allerdings tritt bei 15-20% der Fälle [10-12] auch eine klinisch apparente, hämatogene Streuung auf, bevorzugt in Lunge und Knochen [13].

Eine erste histologische Einteilung wurde im Jahre 1958 durch Horn et al. eingeführt [14] und findet auch heute noch in ähnlicher Weise in internationalen Klassifikationen Anwendung [15]. Das embryonale RMS, mit über 50% die häufigste Form [16], tritt vor allem bei jüngeren Kindern auf und ist durch eine variable Anzahl an spindelförmigen und primitiven runden Zellen, die in myoides Gewebe mit zum Teil myxoiden Bereichen eingebettet sind, charakterisiert [17]. Als Unterformen betrachtet werden der botryoide Typ mit traubenförmigen Wucherungen meist in Hohlorganen wie Blase oder Vagina und der Spindelzell-Typ, bestehend aus fusiformen Zellen [6]. Das embryonale RMS ist vor allem in Mukosa-assoziierten Organen, wie Nasopharynx, Gehörkanal und Urogenitaltrakt lokalisiert und weist eine geringe Metastasierungstendenz und somit eine verhältnismäßig gute Prognose auf [18].

Mit einem Anteil von 25% an allen RMS, ist die alveoläre Variante die zweithäufigste RMS-Ausprägung. Das alveoläre RMS ist histologisch charakterisiert durch die Anwesenheit von fibrovaskulären Septen, welche Räume bilden, die morphologisch Alveolen gleichen und frei flottierende, monomorphe runde Tumorzellen enthalten [19]. Diese histologischen Merkmale werden vor allem bei Tumoren, die Jugendliche betreffen und die in den Extremitäten ihren Ursprung nehmen, gefunden [20, 21]. Da das alveoläre RMS eine schnelle weite Metastasierung aufweist und kaum auf Chemotherapeutika anspricht, ist die Prognose schlechter als bei den embryonalen RMS-Typen [22].

Neben diesen beiden histologischen und auch klinischen Hauptgruppen existieren noch das pleomorphe RMS, welches vor allem bei Patienten über 45 Jahren auftritt und relativ selten ist [6, 18], sowie weitere undifferenzierte Unterformen.

Obwohl es Assoziationen von RMS zu diversen Syndromen gibt, wie z.B. Neurofibromatose Typ 1 [23], Beckwith-Wiedemann Syndrom [24] oder Li-Fraumeni Syndrom [25], scheint es wohl doch so zu sein, dass die Mehrzahl der Fälle sporadisch auftritt [16]. Es ist bekannt, dass im RMS verschiedene strukturelle und numerische Chromosomenabberationen gefunden werden können. So weisen embryonale RMS einen charakteristischen Verlust der Heterozygotie auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11 (11p15.5) auf [26, 27]. Diese genetische Veränderung betrifft den Locus von *IGF2* (*insulin like growth factor 2*) und führt somit zu einer Überexpression dieses Wachstumsfaktors [28].

Das alveoläre RMS ist dagegen mit zwei typischen reziproken Translokationen assoziiert. Einerseits kann hierbei Chromosom 1 und 13 (t(1;13)(p36;q14)), andererseits Chromosom 2

und 13 (t(2;13)(p35;q14)) betroffen sein [22]. Durch diese strukturellen Veränderungen der Chromosomen treten in 55% aller alveolären RMS das Fusionsprotein PAX3-FKHR und in 22% der Fälle das Fusionsprotein PAX7-FKHR auf [29]. Durch diese chimären Strukturen kommt es zu einer inadäquaten Aktivierung der Zielgene von PAX3 und PAX7 und somit zur onkogenen Deregulation von Zellwachstum und Zelldifferenzierung [7, 30, 31] (Abbildung 1).

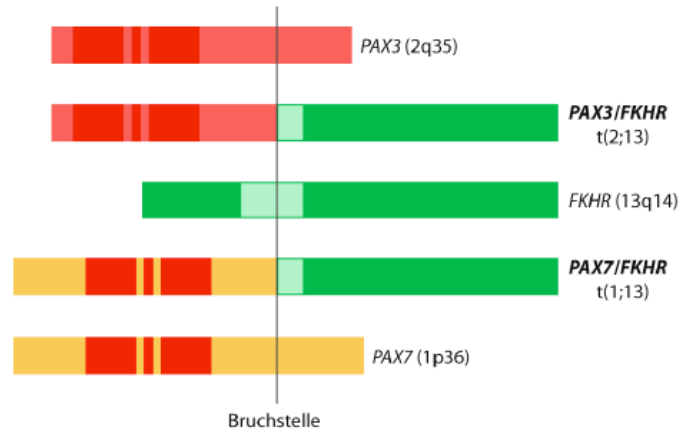


Abbildung 1: Genetische Translokationen des alveolären RMS

Die Fusionsgene *PAX3/FKHR* und *PAX7/FKHR* entstehen durch Translokationen zum einen zwischen Chromosom 2 und 13 und zum anderen Chromosom 1 und 13. Es kommt zur Fusion des *PAX3*-Lokus auf 2q35 bzw. des *PAX7*-Lokus auf 1p36 mit dem *FKHR*-Lokus auf 13q14. Modifiziert nach Meyer et al., 2004 [16]

Durch den heutigen multimodalen Therapieansatz mit chirurgischer Intervention, Chemo- und Radiotherapie und die umfassenden Staging-Untersuchungen konnten die Heilungsraten in den letzten Jahren drastisch verbessert werden. Die 5-Jahresüberlebensrate für alle RMS liegt daher bei ca. 72% [8]. Allerdings gibt es deutliche Unterschiede der Prognosen zwischen den einzelnen RMS-Subtypen. So schneiden embryonale RMS mit einem 3-Jahre-tumorfreen Überleben von 83% am besten ab, wohingegen alveoläre RMS mit 66% und weitere undifferenzierte Formen mit 55% ein deutlich schlechteres Outcome aufweisen [32].

1.2 Epigenetische Genregulation

Der Begriff der Epigenetik wurde ursprünglich von Conrad Waddington im Jahre 1942 geprägt und sollte die verschiedenen Interaktionen von Genen mit deren Umgebung beschreiben, welche letztlich zur Ausprägung bestimmter Phänotypen führen [33]. Er schlug damit die Verbindung von der reinen Entwicklungsbiologie zur Genetik und schuf somit eine wichtige Grundlage für die moderne Wissenschaft. Das heutige Verständnis von Epigenetik geht allerdings weit über diese Definition hinaus. So bezieht sich der moderne Begriff der Epigenetik auf vererbare Änderungen der Genexpression, die allerdings nicht auf einer Modifikation der DNA-Sequenz beruhen [34]. Diese epigenetischen Modifikationen sind nicht nur über die Mitose und Meiose hinaus stabil, sondern können auch über mehrere Generationen weitervererbt werden [35, 36].

Die zwei epigenetischen Hauptmechanismen, die hierfür verantwortlich sind, sind zum einen Methylierungen von DNA und zum anderen Modifikationen von DNA-verpackenden Proteinen. Letzteres geschieht meist über posttranslationale Modifikationen an Histonen. Die DNA ist an Oktameren dieser Histone aufgewickelt, wobei jedes Oktamer aus zwei Kopien der vier Kernhistone H2A, H2B, H3 und H4 besteht. Diese Kombination aus DNA und Histonen, auch Chromatin genannt, kann zwei verschiedene Konformationszustände einnehmen [37]. Das sogenannte Heterochromatin besteht aus stark kondensierter DNA und spiegelt eine kompakte Chromatinkonfiguration wider, die durch die erschwerte Bindung von Transkriptionsfaktoren und RNA-Polymerasen genetisch wenig aktiv ist und folglich nur eine geringe Anzahl exprimierter Gene enthält. Im Gegensatz hierzu ist das Euchromatin lockerer verpackt, ermöglicht somit eine höhere Transkriptionsrate und enthält den Großteil aller aktiven Gene [38, 39]. Für die Ausbildung dieser verschiedenen Konformationszustände sind eine Reihe reversibler epigenetischer Modifikationen verantwortlich, wie die Histon-Acetylierung, -Methylierung, -Ubiquitinierung, -Phosphorylierung und -ADP- Ribosylierung. Eine Acetylierung zieht beispielsweise eine transkriptionelle Aktivierung nach sich, da die Affinität der Histone zur DNA und damit auch deren Kondensationsgrad verringert wird. Die Methylierung der Histone kann dagegen verschiedene Effekte nach sich ziehen. So führt die Methylierung des Lysinrestes 9 an Histon 3 zur Ausbildung von Heterochromatin, wohingegen der methylierte Lysinrest 4 oder 27 ebenso an Histon 3 mit dem genetisch aktiven Euchromatin vergesellschaftet ist [39-41]. Diese Fülle an epigenetischen Histonmodifikationen und deren Wirkmechanismen spielen eine entscheidende Rolle in der Regulation der Genexpression und sind bei weitem noch nicht vollständig aufgeklärt.

DNA-Methylierung, das zweite große Feld der Epigenetik, ist für die Genregulation von nicht minder großer Bedeutung. Hierbei werden Methylgruppen von S-Adenosyl-Methionin durch DNA-Methyltransferasen (DNMT) auf das 5'-Kohlenstoffatom von Cytosinen, die sich in

CpG-Dinukleotiden befinden, übertragen [34]. Die meisten dieser CpG-Dinukleotide (70-80%) [42] sind in menschlichen somatischen Zellen methyliert. Von großer Bedeutung ist jedoch, dass ein Teil der CpG-Dinukleotide in sogenannten CpG-Inseln angeordnet sind, die eine nur sehr geringe Methylierungsrate aufweisen. Es handelt sich hierbei um DNA-Abschnitte, die einen hohen Anteil an CpG-Gruppen enthalten und sich oft in Promotorbereichen verschiedener Gene befinden. Es wird davon ausgegangen, dass annähernd 60% aller Gene mit solchen CpG-Inseln assoziiert sind und dadurch die Genexpression reguliert werden kann [34, 43-45]. Kommt es zu einer Methylierung dieser CpG-Inseln in den Promotorbereichen, führt dies zu einer erschwerten Bindung der Transkriptionsfaktoren an die DNA und damit zu einer Stilllegung („silencing“) des betroffenen Gens [33, 44]. Dieser Mechanismus ist mitverantwortlich für eine Vielzahl physiologischer Vorgänge, wie der X-chromosomalen Inaktivierung [46, 47], der parentalen Prägung [48, 49] und der Ausschaltung repetitiver DNA-Sequenzen [50].

Die für die Methylierung zuständigen DNMTs werden funktionell in zwei Gruppen unterteilt. Zum einen gibt es die *de novo*-Methyltransferasen DNMT3A und DNMT3B. Diese sind essentieller Bestandteil der Entwicklung des Säugers und werden vor allem in embryonalem Gewebe exprimiert, wohingegen adulte somatische Zellen nur niedrige Expressionslevel aufweisen [51]. Dies deutet sehr daraufhin, dass *de novo*-Methylierung hauptsächlich in diesem frühen Abschnitt der Entwicklung aktiv ist [52], es gibt jedoch auch Hinweise, dass sie in späteren Phasen vorkommen kann [44]. Zum anderen ist die Erhaltungsmethyltransferase DNMT1 zu nennen, die für die Aufrechterhaltung (*maintenance*) des Methylierungsmusters über die verschiedenen Zellteilungen hinweg zuständig ist. Das einfachste Model ist hierbei die Übertragung der Methylierung des semikonservativen paternalen DNA-Strangs auf den neu replizierten noch unmethylierten DNA-Strang mittels DNMT1 [53, 54]. Es gibt allerdings Hinweise, dass diese Erklärung für die Aufrechterhaltung der Methylierung zu oberflächlich ist und es noch weitere Mechanismen sowohl der *de novo*-[55] als auch der *maintenance*-Methylierung zu geben scheint [56]. Diese könnten letztlich auch die Veränderungen des Methylierungsmusters im Alter und in Tumorzellen erklären [34].

Menschliche Tumoren weisen oft einen massiven Verlust der globalen DNA-Methylierung auf, zeigen allerdings auch spezifische neue Hypermethylierungsmuster derjenigen CpG-Inseln, die in Promotorbereichen lokalisiert sind. Diese Promotorhypermethylierung, teilweise auch in Kombination mit Histon-Deacetylierung, führt zur Repression von Tumorsuppressorgenen und stellt damit einen entscheidenden Faktor für die Entwicklung von Tumoren dar [34, 57-59] (Abbildung 2). So ist beispielsweise für *p16* in Magenkarzinomen [60] sowie hepatozellulären Karzinomen [61] oder für *RASSF1A* in Rhabdomyosarkomen, Medulloblastomen, Neuroblastomen [4] und Hepatoblastomen [62]

die epigenetische Reprimierung der Genexpression bekannt. Durch die Hypomethylierung repetitiver DNA-Sequenzen und im Zusammenspiel mit aberranten Histonmodifikationen kann es des Weiteren zu einem Verlust der Integrität des Chromatins und somit zu einer genetischen Instabilität kommen, die das Tumorstadium mitbegünstigen kann [58, 63] (Abbildung 2).

Die weitere Aufklärung dieser epigenetischen Mechanismen kann also von großer Bedeutung sein für die Weiterentwicklung diagnostischer Mittel, die Früherkennung und letztlich die Therapie der verschiedensten Tumoren.

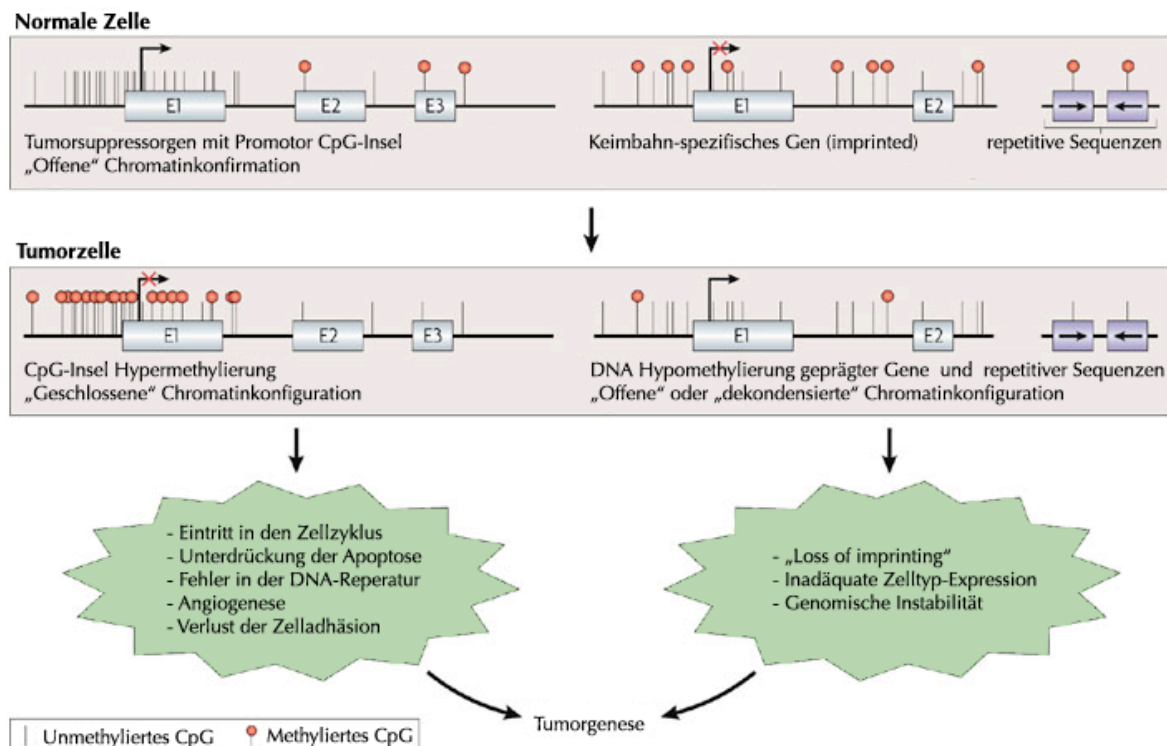


Abbildung 2: Veränderte DNA-Methylierungsmuster in der Tumorgenese

Die Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen ist in Tumoren weit verbreitet und führt zu einer transkriptionellen Inaktivierung dieser Gene mit Verlust der normalen zellulären Funktion. Die gleichzeitige globale Hypomethylierung repetitiver DNA-Sequenzen und auch gewebsspezifischer oder parental geprägter Gene ist ein weiterer Mechanismus, der die Tumorentstehung mitbegünstigen kann. So führt diese Hypomethylierung teilweise zu einem „loss of imprinting“ und folglich zu einer Reexpression dieser normalerweise reprimierten Gene, wie z.B. *IGF2* [64], und kann zu der für Tumoren charakteristischen genomischen Instabilität beitragen.

Abbildung modifiziert nach Esteller 2007 [58].

1.3 Der BMP – Signalweg

Der Wachstumsfaktor Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP2) ist Teil der BMP-Familie, welche zu der Transforming Growth Factor- β Superfamilie gerechnet wird [5]. Zuerst beschrieben wurde *BMP2* als Initiator von Knochen- und Knorpelwachstum im Jahre 1988 [65], seine Funktionen und Wirkmechanismen gehen allerdings weit über dieses Feld hinaus. Es ist bekannt, dass diese Proteine in sehr vielen verschiedenen, zum Teil auch diversen Vorgängen involviert sind, wie beispielsweise Zellproliferation, Apoptose, Differenzierung und Morphogenese. So ist *BMP2* sowohl in der embryonalen Entwicklung von essentieller Bedeutung [66, 67], als auch in die Differenzierung unterschiedlicher Organe mit eingebunden [68, 69].

BMP2 entfaltet seine Wirkung über die Bindung an einen transmembranen Serin-Threonin-Kinase Rezeptorkomplex, der aus je zwei Paaren des Typ I- und Typ II-Rezeptors aufgebaut ist. Für BMP2 sind zwei spezifische Typ I-Rezeptoren (BMPRIA und BMPRIB) und ein spezifischer Typ II-Rezeptor (BMPRII) bekannt [70, 71]. Nach Bindung des Liganden kommt es zur Phosphorylierung von Rezeptor-regulierten Smad-Proteinen (R-Smad), welche mit Smad4 heterodimerisieren und daraufhin in den Zellkern transloziert werden. Dieser Komplex kann im Folgenden über die Bindung an spezifische DNA-Domänen Zielgene entweder aktivieren oder reprimieren, je nachdem welche Cofaktoren zusätzlich noch beteiligt sind [72-75] (Abbildung 3). So kann es beispielsweise zu einer Aktivierung der Zielgene *ID1*, *ID2* und *ID3* (inhibitor of DNA binding proteins) kommen [76, 77]. Dieser BMP2-Signalweg wird streng durch verschiedene Proteine reguliert, wie Noggin und Chordin, die in negative extrazelluläre Feedback-Schleifen eingebunden sind [78], intrazelluläre inhibitorische Faktoren wie BAMBI (BMP and activin membrane bound inhibitor) [79] und inhibitorische Smads oder Smurf1 (Smad ubiquitination regulatory factor-1) [73]. Des Weiteren ist bekannt, dass der BMP-Signalweg mit anderen Signalwegen, zu nennen sind hier der WNT/ β -Catenin- [80, 81], der TGF- β /Activin- [81], der ERK-MAPK- [82] und der JAK-STAT-Signalweg [73], interagieren kann und sich diese gegenseitig beeinflussen.

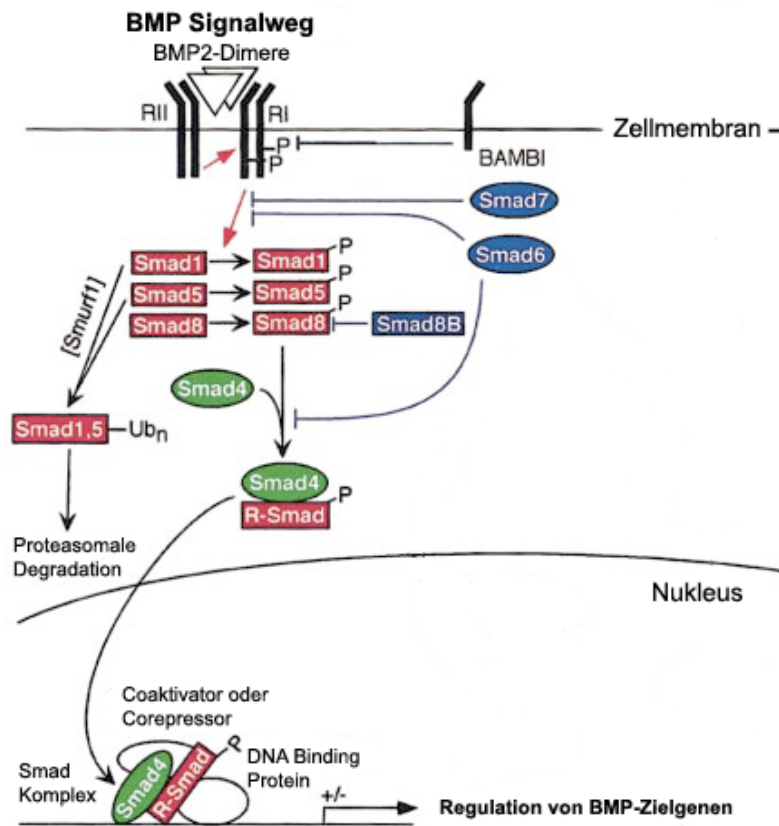


Abbildung 3: BMP - Signalweg

Über die Bindung von BMP-Dimeren, in diesem Fall BMP2, kommt es zu einer Phosphorylierung des Typ I-Rezeptors durch den Typ II-Rezeptor. Dies führt im Gegenzug zur Phosphorylierung eines R-Smad-Proteins (Smad1, Smad5 oder Smad8). Dieses aktivierte R-Smad kann im Folgenden als Komplex mit Smad4 in den Zellkern gelangen und im Beisein verschiedener Kofaktoren die Genexpression der entsprechenden Zielgene beeinflussen. Im Rahmen eines negativen Feedback-Loops kommt es zur Aktivierung von BAMBI und weiteren Smad-Proteinen (Smad6, Smad7, Smad8B), die, ebenso wie Smurf1, über verschiedene Mechanismen den BMP-Signalweg inhibieren können. Abbildung modifiziert nach von Bubnoff et al., 2001 [73].

Neben diesen physiologischen Wirkmechanismen von *BMP2* hat sich in den letzten Jahren gezeigt, dass *BMP2* auch in die Tumorgenese involviert ist. Die Rollen die dieses Gen hier zu spielen scheint, sind, ebenso wie unter physiologischen Bedingungen bekannt, sehr vielfältig und zum Teil auch gegensätzlich. Es zeigen sich zum einen Effekte, die das Tumorstadium begünstigen, es gibt aber andererseits auch Hinweise darauf, dass *BMP2* als Tumorsuppressorgen anzusehen ist.

So ist bekannt, dass *BMP2* die Tumorigenese und die Migrationsfähigkeit der kanzerösen Zellen, beides für die Tumorigenese entscheidende Vorgänge, positiv beeinflussen kann [83, 84]. In einem Xenograft-Mausmodell für Brustkrebs entwickelten sich im Rahmen einer Überexpression von *BMP2* vaskularisierte Tumoren, im Gegensatz zu den mit Leervektor transfizierten Brustkrebszellen, die zu keiner Tumorbildung in der Maus führten [84]. Die für den Tumor wichtige Fähigkeit der Zellmigration konnte in

Magenkarzinomzellen und Lungenkarzinomzellen durch die Behandlung mit rekombinantem BMP2 gesteigert werden [85, 86]. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass *BMP2* in der Metastasierung ein wichtiger Faktor zu sein scheint.

Auf der anderen Seite gibt es eine Vielzahl an Hinweisen, dass *BMP2* eine Rolle als Tumorsuppressorgen innehat und es in Tumorzellen häufig zu einem Verlust der *BMP2*-Expression kommt. Eine Arbeit aus dem Jahre 1998, in welcher kultivierte Tumorzellen von 65 verschiedenen Tumortypen (Mamma-, Ovar-, Prostata-, Lungentumore und andere) mit rekombinantem BMP2 behandelt wurden, zeigte, dass dieses Protein bei keiner der 65 Proben die Zellproliferation steigerte. Bei 25% der Proben konnte hingegen eine Inhibition der Proliferation nachgewiesen werden, die mit der Konzentration von rekombinantem BMP2 korrelierte [87]. Diese Ergebnisse wurden auch in anderen Arbeiten bestätigt. So ist die Expression von *BMP2* in Prostatakarzinomen beispielsweise stark vermindert gegenüber der Expression in normalem Prostatagewebe. Nach Behandlung mit rekombinantem BMP2 zeigt sich ein vermindertes Androgen-abhängiges Wachstum der Prostatakarzinomzelllinien. Ein Expressionsverlust von *BMP2* wurde in Verbindung gebracht mit einem aggressiverem Phänotyp und einem geringeren Rückfall-freiem Intervall [88, 89]. Auch in Nebennierenrindenkarzinomen, Mammatumoren, Medulloblastomen und Myelom-Zellen wurde durch BMP2-Behandlung eine verminderte Zellproliferation beobachtet und zum Teil eine Induktion der Apoptose erreicht [90-93].

Weiterhin ist bekannt, dass der BMP2/Smad-Signalweg bei familiärer adenomatöser Polyposis Coli durch Mutationen in *BMPR1A*- oder *SMAD4*-Genen gestört sein kann, und es dadurch zu einer stärkeren Ausprägung des Phänotyps kommt [94]. Diese Inaktivierung des BMP-Signalweges ist teilweise auch in sporadischen Colonkarzinomen mit an der Tumorentstehung beteiligt. Nach Stimulation von Colonkarzinom-Zellkulturen mit rekombinantem BMP2 kommt es allerdings, entgegen der Erwartung bei einer vermeintlich gestörten Signaltransduktion, dennoch zu einer Abnahme der Proliferation. Es wird daher vermutet, dass es noch andere Signalwege geben muss, die für die Vermittlung der Wirkungen von BMP2, in diesem Fall der Proliferationshemmung, verantwortlich sind [95, 96].

Die angeführten Studien und die darin implizierten Wirkungsmechanismen zeigen, dass BMP2 ein äußerst vielseitiges Protein ist und die Expression dieses Gens je nach Zellart eine große Bandbreite an Effekten aufweisen kann. *BMP2* spielt so neben physiologischen Vorgängen im menschlichen Körper auch in aberranten Mechanismen, wie der Tumorentstehung und -progression, entscheidende Rollen.

2 Aufgabenstellung

Das RMS ist das häufigste Weichteilsarkom des Kindesalters und trotz verbesserter Therapieverfahren immer noch mit einer hohen Mortalität behaftet. Die Entwicklung neuer Therapien wurde bislang durch das fehlende Wissen um die exakten molekularen Mechanismen der Entstehung von RMS behindert. Derzeit werden epigenetische Veränderungen in Form von DNA-Methylierungen von Tumorsuppressorgenen, die zu deren Unterdrückung führen, als ein bedeutender Mechanismus bei der Entstehung von Tumorerkrankungen diskutiert.

Das erste Ziel dieser Arbeit war deshalb die Identifizierung epigenetisch regulierter Gene im RMS, welche über Promotor-Hypermethylierung supprimiert sind. Hierfür sollten drei verschiedene RMS-Zelllinien zunächst mit dem demethylierenden Agens 5-Aza-2'-deoxycytidin behandelt werden und im Folgenden mögliche Reaktivierungen bestimmter Gene, welche in embryonalen Signalwegen wie z.B. dem Hedgehog-, BMP-, WNT- und MAPK/ERK-Signalweg eine Rolle spielen, untersucht werden. Anschließend sollte der Methylierungsgrad von Kandidatengenen mittels Bisulfitsequenzierung und der methylspezifischen PCR bestimmt werden.

Nach einer erfolgreichen Identifizierung solcher über Promotor-Hypermethylierung reprimierter Gene, sollten diese in den RMS-Zelllinien zum einen über die Transfektion eines Expressionsplasmides und zum anderen über die Behandlung mit rekombinantem Protein reaktiviert werden. Im Folgenden sollten dann die Auswirkungen dieser Reaktivierung auf tumorbiologische Prozesse wie Proliferation, Apoptose und die Expression verschiedener Zielgene untersucht werden.

Zusammenfassend sollten diese Versuche neue Erkenntnisse über die molekularen Mechanismen, welche in der RMS-Genese entscheidend sind, liefern und so auch möglicherweise zu neuen Ansätzen in der Tumorbehandlung führen.

3 Materialien

3.1 Zelllinien

Prokaryotische Zellen:

TOP10F'

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Eukaryotische Zelllinien:

Tabelle 1: Auflistung aller verwendeten eukaryotischen Zelllinien

Bezeichnung	Ursprung	Bezogen von	Kultivierungs- medium
HepG2	Humanes Hepatoblastom	ATCC, Manassas, VA, USA	RPME + 10 % FBS + 1%PenStrep
RD	Humanes ERMS	ATCC, Manassas, VA, USA	DMEM + 10 % FBS + 1% PenStrep
RH30	Humanes ARMS	DSMZ GmbH, Braunschweig	RPME + 10 % FBS + 1% PenStrep
RMS13	Humanes ARMS	ATCC, Manassas, VA, USA	RPME + 10 % FBS + 1% PenStrep

3.2 Zellmedien

Medien für prokaryotische Zellen:

LB-Medium (Luria/Miller)

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

LB-Agar (Luria/Miller)

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Medien für eukaryotische Zellen:

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (1x),

liquid (High Glucose) – with GlutaMAX™ I

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

RPME 1640 Medium (1x),

liquid-with GlutaMAX™ I

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Einfriermedium:	50 ml	FBS
	40 ml	DMEM
	12,5 ml	DMSO

3.3 Antibiotika

Antibiotika zur Selektion prokaryotischer Zellen:

Ampicillin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kanamycin	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz

Antibiotika zur Selektion eukaryotischer Zellen:

G418	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
------	--------------------------------------

Antibiotika für Zellkultur:

Penicillin, Streptomycin – PenStrep	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
-------------------------------------	----------------------------

3.4 Enzyme

CpG Methyltransferase (M.SssI)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
<i>EcoRI</i>	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Fast Digest™ <i>Sma I</i>	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
<i>HindIII</i>	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
iTaq SYBR Green Supermix with ROX	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Maxima Hot Start <i>Taq</i>	
DNA Polymerase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Proteinase K	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ribonuclease H (RNase H)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
SuperScript® II Reverse Transcriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trypsin-EDTA (1x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe

3.5 Plasmide

pBMP2	Prof. Dr. Beuschlein, Medizinische Klinik, LMU München
pcDNA3.1	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pCR®2.1	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pDEST26	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pEGFP	Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA
pGEM®-T Easy	Promega GmbH, Mannheim
pIRES2-EGFP	Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA

3.6 Größenstandards

Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder

Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder

Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

3.7 Primer

Für die cDNA-Synthese wurden „random“ Primer von Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, verwendet. Die Primersequenzen für die anderen Anwendungsbereiche sind in den nachstehenden Tabellen aufgelistet und wurden von Eurofins MWG Operon, Ebersberg, bezogen:

Tabelle 2: Auflistung aller für die quantitative *real-time* PCR verwendeten Expressionsprimer.

Bez	Sequenz fw	Sequenz rev	AL	Lok
AKT1	TTGCTTTCAGGGCTGCTCA	CAAAGAAGCGATGCTGCATG	91	Ex12/13
AKT3	GATCACAGATGCAGCCACCA	TGCTCGGCCATAGTCATTATCTT	91	Ex9/10
AXIN1	AGCGAGCAGCAGAGCCTG	TGCTTACGGATCCTGTATGGG	91	Ex3/4
AXIN2	TATCCAGTGATGCGCTGACG	TGTTTCTTACTGCCCACACGAT	91	Ex3/4
BAD	GGAGGATGAGTGACGAGTTTGTG	GAGCTTTGCCGCATCTGC	91	Ex3/4
BAX	CGGGTTGTCGCCCTTTT	AGCCCATGATGGTTCTGATCA	91	Ex3/4
BCL2	CGCCCTGTGGATGACTGAGTAC	CAAACAGAGGCCGCATGCT	113	Ex2/3
BID	AGACTGATGGCAACCGCAG	CTGGCAATATTCCGGATGATG	91	Ex3/4
BIRC5	GGACAGAGAAAGAGCCAAGAACAA	CCAGCTGCTCGATGGCAC	134	Ex3/4
BMI1	ACCAGAGAGATGGACTGACAAATG	GTGGAGGGAATACCTCCTGCT	91	Ex6/7
BMP2	CAGCCAGCCGAGCCAA	AATCTCCGGGTTGTTTTCCC	91	Ex2/3
BMP4	CTTGAGTATCCTGAGCGCCC	CACTGGTCCCTGGGATGTTCT	91	Ex3/4
BMPR1A	CTACCAAAGTGTCTAATGCGC	CAAATAGAGCTGAGTCCAGGAACC	91	Ex9/10
BMPR1B	CCATTGTCCAGAAGACTCAGTCAA	CACAGGCAACCCAGAGTCATC	91	Ex4/5
BMPR2	TGGACGCATGGAATATTTGC	GCTTACCCAGTCACTTGTGTGG	91	Ex6/7
CCNB1	AACCTTTGGTCTGGGTCGGC	TGGCCAAAGTATGTTGCTCG	91	Ex6/7
CCND1	TCACACGCTTCCTCTCCAGA	AGGCTTGACTCCAGCAGGG	91	Ex4/5
CCND2	AAGCTGTCTCTGATCCGCAAG	CGATCATCGACGGTGGGTAC	91	Ex3/4
CDH1	CGAGAGCTACACGTTACGG	TTGTCGACCGGTGCAATCT	91	Ex2/3
CDK2	GGGCTGCATCTTTGCTGAG	CAGAGTCCGAAAGATCCGGA	91	Ex5/6
CDK4	AGTGCAGTCGGTGGTACCTGA	GGCAGAGATTCGCTTGTGTG	91	Ex7/8
CDKN1A	AGGCTGAAGGTCCCCAG	CGGCGTTTGGAGTGGTAGAA	91	Ex2/3
CDKN1B	GAAGCGACCTGCAACCGA	GCTCCACAGAACCGGCATT	101	Ex1/2
CDKN1C	GCGGCGATCAAGAAGCTG	GGACATCGCCCGACGAC	91	Ex1/2
CDKN2A	AGGCAGTAACCATGCCCG	TTCCCGAGGTTTCTCAGAGC	91	Ex2/3
CDKN2B	AGCTGAGCCCAGGTCTCCTAG	CACCGTTGGCCGTAAACTTAAC	91	no
CTNNB1	GCCGTACGTCCATGGGTG	CCGAGCTAGGATGTGAAGGG	101	Ex10/11
DKK1	GCTGCCCCGGAATTACT	TGGTTTCCTCAATTTCTCCTCG	81	Ex2/3

DKK2	CATGTGCTGCCCCAGTACC	ACCATCCAGAGCCGGGAT	91	Ex2/3
DLL1	CAGCCCTGGCAGTGCAAC	TCTTGCAGGGCTTATGGTGTG	91	Ex6/7
DLK1	GCAACCCCCAAAATGGATTC	GAGGTCACGCACTGGTCACA	91	Ex2/3
DTX1	AGCTTGTGCCCTACATCATCG	TCGTAGAAGTTGCGCCGC	91	Ex1/2
DVL1	CAAGATCACCTTCTCCGAGCA	CCCACTGGAGCCACTGTTG	91	Ex6/7
DVL2	TCTTCGGAGACCTCAGTGGTG	TCCTGGTCTGAAGCCCCA	91	Ex13/14
EZH2	AACAGCGAAGGATACAGCCTG	TTGTGTTGGAAAATCCAAGTCACT	101	Ex3/4
FOXA2	GACTGGAGCAGCTACTATGCAGAG	CATGCCGTTTCATCCCCA	81	Ex2/3
FOXF1	AGCCGTATCTGCACCAGAACA	CATGGCGTTGAAAGAGAAGACA	121	Ex1/2
FZD1	CCTGTTTATCGGCACGTCCT	GTGCCATCGTGCTTCATGAT	81	no
FZD2	GCCCCGACTTCACGGTCTACA	CCCGACCAGATCCAGAAGC	81	no
GADD45A	GGACCTGCACTGCGTGCT	ACTTTCCCGGCAAAAACAAA	91	Ex3/4
GLI1	AGCTACATCAACTCCGGCCA	GCTGCGGCGTTCAAGAGA	115	Ex11/12
GLI2	TTCTCCAACGCCTCGGAC	GCCTGGGATCTTGCAAGATGT	81	Ex8/9
GLI3	TCAAAGCGGGAAGAATGCC	CTGACCACCAGGGCTTGG	81	Ex12/13
HES1	AGGCGGACATTCTGGAAATG	GTAATCCCCAGCACACTTGG	101	Ex3/4
HHIP	TGTACATCATTCTTGGTGATGGG	AGCCGTAGCACTGAGCCTGT	91	Ex6/7
ID1	AACGGCTGTTACTCACGCCT	CGATGACGTGCTGGAGAATCT	91	no
ID3	CCTGGACCCCCTGATGG	GGCAAAAGCTCCTTTTGTCTG	91	Ex1/2
IGF1	TGGTGGATGCTCTTCAGTTCG	TGAGGCGCCCTCCGA	91	Ex2/3
IGF1R	CGATGTGTGAGAAGACCACCA	CCACACGTGCTTGGGCA	91	Ex2/3
IGF2	CCTCCGACCGTGCTTCC	GGTGGACTGCTTCCAGGTGT	81	Ex3/4
IGFBP3	GTCCAAGCGGGAGACAGAATAT	CCTGGGACTCAGCACATTGA	91	Ex2/3
IHH	GGCTTTGACTGGGTGTATTACGA	AGCAGCCGCCCCTCTT	91	Ex2/3
IRS1	GCAGATGAGTTGTCCCCGTC	CTCTGCAGCAATGCCTGTTC	91	no
IRS2	CGGTTGTCTGCGGAGCG	CCTCACGTCGATGGCGAT	91	no
LEF1	CCCCACACTGACAGTGACCTAA	AATGTGAGGTCTTTTTGGCTCCT	81	Ex7/8
LFNG	TCTGAAGATGAGCCCCTGG	GATGTAGCCGATGGTGACGTC	91	Ex5/6
JAG1	GGCCAAATGGGATGATGACT	CAGGCAAGGTCGAGGGC	91	Ex22/23
JAG2	TGCATCTGTGACAGTGGCTTTA	TGCATGTGCCCCATTG	91	Ex14/15
MDM2	TAGCAGTGAATCTACAGGGACGC	AACTGAATCCTGATCCAACCAATC	91	Ex8/9
MYC	CACCACCAGCAGCGACTCT	CAGACTCTGACCTTTTGCCAGG	101	Ex2/3
MYCN	CTCCGGAGAGGACACCCTG	GTGACCACGTCGATTTCTTCC	81	Ex2/3
NOTCH1	TGAGAACAACACGCCTGACTG	CGGGTGGACACAGGCAG	91	Ex18/19
NOTCH2	GAGTGTGCGTCCAACCCCT	CACCCTGATAGCCTGGGACA	91	Ex21/22
NUMB	CATATGCCGTGATGGCACC	GCCTACTGCATGGCTCAACC	91	Ex3/4
PDGFRA	TGGATTGAACCTGCTGATG	ATCAGCCTGCTTCATGTCCAT	91	Ex15/16
PLAG1	ACAAGTGCATACAACAAGACTGCA	CAGGAGAATGAGTAGCCATGTGC	81	Ex4/5
PSEN1	TTTTATACCCGGAAGGATGGG	TCAGAATTGAGTGCAGGGCTC	91	Ex4/5
PSEN2	CACAGAGAAGAATGGACAGCTCA	GGTGTTCAGCACGGAGTTGA	91	Ex5/6
PTCH1	TTGATTGTGGGTGGCACAGT	GCTTGGGAGTCATTAAGTGAAC	89	Ex7/8
PTCH2	TTGCTGCTCCAGTCACATGC	GGTGGCTCCGTAGAGGCTC	81	Ex14/15
RASSF1A	GGCGTCGTGCGCAA	GATCTTCTGCTCAATCTCAGCTTG	91	Ex1/2
RB1	CTCCTAAACCACTGAAAAAACTACGC	TGAAATTTGGAAGTCTCCTGGGA	91	Ex25/26
SHH	CTGGGTGTACTACGAGTCCAAGG	CAGCCTCCCGATTTGGC	81	Ex2/3

SMAD3	TCCAATGTCAACAGGAATGCA	CGAAGACCTCCCCTCCGAT	91	Ex6/7
SMAD5	ACAATTGAAAACACTAGGCGACATAT	TGCTGTCACTGAGGCATTCC	91	Ex6/7
SMO	GGAGAGGAGCCATACTGCCC	TCAACCAGCCACAGGTTGG	91	Ex11/12
SMURF1	ATCTGCTGAAGCCTTTTGACCA	CGCGTGTTGCACTTCCAGT	91	Ex16/17
SNAI1	ACCCAATCGGAAGCCTAAC	GCCAGCAGGTGGGCCT	91	Ex1/2
SNAI2	GGCAAGGCGTTTTCCAGAC	CTCTGTTGCAGTGAGGGCAA	91	Ex2/3
SOCS1	GGAAGTGTCTTTTCGCCCTT	CCATCCAGGTGAAAGCGG	91	no
SPP1	GTTTCGCAGACCTGACATCCA	CCATTCAACTCCTCGCTTTCC	81	Ex5/6
SPRY2	GCCCTCACCCAGCAGGTAC	GGACGACAGTAGGCCCTCT	91	Ex2
SUFU	ATGCTGCTGACAGAGGACCC	CTTCAGTGACAGACCAACGAT	91	Ex4/5
TBP	GCCCCGAAACGCCGAATAT	CCGTGGTTCGTGGCTCTCT	72	Ex4/5
TCF7	GCCATTGTGCCCCCT	CTCTGCCTTGACTCTGCTTG	81	Ex6/7
TGFB1	TGGAGAGGGCCCAGCAT	ACGCAGCAGTTCTTCTCCGT	91	Ex5/6
TGFB2	TGAGTCACAACAGACCAACCG	TGGACGTAGGCAGCAATTATCC	91	Ex5/6
TGFB3	GGACACCAATTACTGCTTCCG	CCACTTCCAGCCCAGATCC	91	Ex5/6
TGFBR1	GATAAACTTGCTCTGTCCACGG	TCTATGAGCAATGGCTGGCTT	91	Ex5/6
TGFBR2	TGTGACTTTGGGCTTTCCCT	CCATGTATCTTGCAGTTCCCAC	91	Ex4/5
TGFBR3	TGGCTAATAGATTTTCATCTTCGGC	AGGATCCGTAGCTCAGGAGGA	91	Ex8/9
TGIF	TTGCTGTCCCAGCAAACACA	TTCTCAGCATGTCAGGGAGGA	91	Ex2/3
TP53	TGAATGAGGCCTTGGAACCTCAA	GGAGGTAGACTGACCCTTTTTGGA	141	Ex10/11
TP53I3	GAAGCAACGCTGAAATTCACC	GGCAGTTGACGTTCTTCTCCC	91	Ex3/4
TWIST1	TCCGCGTCCCCTAGCAG	TGTCCATTTTCTCCTTCTCTGGA	91	Ex1/2
ULK3	ATCCTCAAGGGCATTTCGACA	CGCAAACTCCATGATGAGGT	92	Ex2/3
WIF1	TGGGAACAGTGCCTCACAAG	CAAATGCTGCCACCCCAT	81	Ex3/4
WISP1	CGCACCCCGTGACACAG	GGGCTTGTGTAGGCTATGCAGT	81	Ex3/4
WNT5A	AGGTGGAAGTGCAGCACTGTG	TCACCGCGTATGTGAAGGC	91	Ex2/3

Es sind jeweils die Bezeichnung (Bez), die Sequenz des Vorwärts-Primers (Sequenz fw) und des Rückwärts Primers (Sequenz rev) in 5'-3'-Richtung, die Amplikonlänge (AL) in Basenpaaren und die Lokalisation (Lok) der Primer innerhalb des Gens anhand der Exons (Ex) angegeben.

Tabelle 3: Auflistung aller für die methylspezifische PCR verwendeten Primer.

Bez	Sequenz fw	Sequenz rev	AL	Lok
BMP2 R1				
M	GTAGAGCGCGTTATAGCGTC	CATCGCGACGCTAAAAAT	108	-963/-873
U	GGTAGAGTGTGTTATAGTGTGTGG	ACATCACAACACTAAAAATCAACTC	110	-964/-874
BMP2 R2				
M	TGGTATCGAGATCGTCGTC	TCCGAAACTCGAAAATCG	122	-585/-481
U	GTTTGGTATTGAGATTGTTGTTGT	AACTCCAAAACACTCAAAAATCA	128	-588/-484
BMP2 R _{Wen}				
M	GGTTGTTTCGAGTTATGGGTCGC	AAAACCAACGCCCGAAAAACGCG	113	-533/-443
U	GGATGGTTGTTTGGAGTTATGGGTTGT	CCTTAAAAACCAACACCCAAAAAACACA	121	-537/-448

Es sind jeweils die Bezeichnung (Bez), die Sequenz des Vorwärts-Primers (Sequenz fw) und des Rückwärts-Primers (Sequenz rev) in 5'-3'-Richtung, die Amplikonlänge (AL) in Basenpaaren und die Lokalisation (Lok) in Basenpaaren 5' vom Transkriptionsstart angegeben. Es gab für BMP2 drei verschiedenen Regionen, die Region 1 (R1), die Region 2 (R2) und eine Region, die von Wen et al. (R_{Wen}) [97] übernommen wurde. Die Annealing-Temperaturen der BMP2-R1-Primer lagen bei 60 °C, der BMP2-R2-Primer bei 59°C und der BMP2-R_{Wen}-Primer bei 62 °C.

Tabelle 4: Auflistung aller für die Bisulfitsequenzierungs-PCR verwendeten Primer.

Bez	Sequenz fw	Sequenz rev	AL	Lok
BMP2	CAAAGGGCACTTGCCCCAGGG	CAAGTTATTCTCCCTGCAAGTTCA	493	-782/-313

Es sind jeweils die Bezeichnung (Bez), die Sequenz des Vorwärts-Primers (Sequenz fw) und des Rückwärts-Primers (Sequenz rev) in 5'-3'-Richtung, die Amplikonlänge (AL) in Basenpaaren und die Lokalisation (Lok) in Basenpaaren 5' vom Transkriptionsstart angegeben.

Tabelle 5: Auflistung aller für die Sequenzierung verwendeten Primer.

Bez	Sequenz fw	Sequenz rev
M13 fw	CAGGAAACAGCTATGAC	
T7 rev		GGGATATCACTCAGCATAAT
pIRES-EGFP	GTTTAGTGAACCGTCAGATCCG	AGGGGGGGGGGAGGGAGAGGGG

Es sind jeweils die Bezeichnung (Bez), die Sequenz des Vorwärts-Primers (Sequenz fw) und des Rückwärts-Primers (Sequenz rev) in 5'-3'-Richtung angegeben

Tabelle 6: Auflistung aller für das QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit verwendeten Primer.

Bez	Sequenz fw / Sequenz rev
Mut973_BMP2	GGTATCACGCCTTTTACTGCCACGGAGAATGCC / GGGCATTCTCCGTGGCAGTAAAAGGCGTGATACC

Es sind jeweils die Bezeichnung (Bez), die Sequenz des Vorwärts-Primers (Sequenz fw) und des Rückwärts-Primers (Sequenz rev) in 5'-3'-Richtung angegeben.

3.8 Rekombinante Proteine

Rekombinantes humanes BMP2

R&D Systems, Minneapolis, MN, USA

3.9 Chemikalien und Reagenzien

6x DNA Loading Dye

Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

Agarose

PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen

Albumin Fraktion V (BSA)

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

5-Aza-2'-deoxycytidin

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Borsäure

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

β -Mercaptoethanol

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Calcein, AM

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Chloroform

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

dNTPs (100 mM)

Roche Diagnostics GmbH, Penzberg

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
(D-PBS) (1x), without CaCl₂, MgCl₂

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Essigsäure

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Ethanol

Merck KGaA, Darmstadt

Ethidiumbromid, 10 mg/ml

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Ethylendiamintetracyanat (EDTA)

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Fetal Bovine Serum (FBS)

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

FuGENE® 6 Transfection Reagent

Roche Diagnostics GmbH, Penzberg

Isopropanol

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Methanol

Merck KGaA, Darmstadt

Natriumacetat

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Natriumchlorid (NaCl)

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Natriumdodecylsulfat (SDS)

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Phenol

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Salzsäure (HCl)

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

SAM (S-adenosylmethionine)

Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

TRI Reagent® RNA Isolation Reagent

Molecular Research Center, Inc.,
Cincinnati, OH, USA

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
(TRIS)

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

UltraPure™ DNase/RNase-Free

Distilled Water

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

3.10 *Puffer*

STE-Puffer: 10 mM TRIS, pH 8,0
0,1 M NaCl
1 mM EDTA
1 % SDS

TBE-Puffer: 89 mM TRIS, pH 8,0
2 mM EDTA
89 mM Borsäure

TE-Puffer: 10 mM TRIS, pH 8,0
1 mM EDTA

3.11 *Kits*

Agilent Cell Kit	Agilent Technologies GmbH, Böblingen
Annexin V-Cy5 Apoptosis Detection Kit	BioVision, Mountain View, CA, USA
Cell Proliferation Kit I (MTT)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
EpiTect Bisulfite Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAGEN Plasmid Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAGEN Plasmid Midi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla, CA, USA
RNase-Free DNase Set	QIAGEN GmbH, Hilden
RNeasy Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
TA Cloning® Kit (with pCR®2.1 vector)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

3.12 *Verbrauchsmaterial*

5er Reihe 0,2 ml PCR Gefäße	Eppendorf AG, Hamburg
BD Falcon™ Round-Bottom Tubes	BD, Heidelberg
Biosphere® Filterspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

EasyFlasks TM Zellkulturflaschen	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold
Filtertips (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Kryoröhrchen	Schubert&Weiss, Iphofen
LumiNunc TM Microwell Plates	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold
Multidishes Nunclon TM	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold
Nalgene [®] Kryoröhrchen	Schubert & Weiss GmbH, München
PP-Schraubverschluss Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Quarzküvette QS 10 mm	Hellma, Mühlheim
Safe-Lock Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg
Standard 96 Well PCR Plates	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Costar [®] Stripette [®] Serological Pipets	Corning GmbH, Wiesbaden
Zellschaber	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

3.13 Geräte

2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies GmbH, Böblingen
Biofuge fresco	Heraeus GmbH, Hanau
Biofuge pico	Heraeus GmbH, Hanau
BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Centrifuge 5702	Eppendorf AG, Hamburg
Centrifuge J2-21	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Centrifuge LMC-3000	Kisker-Biotech, Steinfurt
CO ₂ -Inkubator MCO-20AIC	Sanyo, Tokio, Japan
Elektroporator EPI 2500	Dr. L. Fischer Laborgeräte, Heidelberg
FACScan	BD, Heidelberg
Feinwaage Te1245	Sartorius AG, Göttingen
GelJet Imager	Intas Science Imaging GmbH, Göttingen
GENios Microplatereader	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Homogenisator Miccra	ART Labortechnik, Mühlheim
Kamera PowerShot G6	Canon, Krefeld
Magnetrührer MR 3001	Heidolph-Elektro GmbH & Co. KG, Kelheim

Mastercycler ep *realplex*² S

Mastercycler personal

Mikroskop Axiovert 40 CFL

Mikroskop IX50

Mikrowelle

Mini®-Sub Cell GT

Pipette Accu-Jet

PowerPac Basic™

Sicherheitswerkbank Hera Safe

Thermomixer Comfort

Thermomixer Compact

Vortex-Genie 2

Waage Vic-1501

Wasserbad GFL 1083

Eppendorf AG, Hamburg

Eppendorf AG, Hamburg

Carl Zeiss Jena GmbH, Jena

Olympus Europa GmbH, Hamburg

Panasonic, Hamburg

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Brand, Wertheim

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Kendro Laboratory Products GmbH,

Hanau

Eppendorf AG, Hamburg

Eppendorf AG, Hamburg

Scientific Industries, NY, USA

Acculab, Edgewood, NY, USA

GFL, Wien, Österreich

4 Methoden

4.1 Epigenetische Methoden

4.1.1 *In vitro de novo* Methylierung

Um eine Positivkontrolle in Bezug auf die Methylierung sowohl für die methylierungsspezifische PCR als auch für die Bisulfitsequenzierung zu erhalten, wurde genomische DNA aus dem Blut eines gesunden Probanden mit CpG-Methyltransferase (M.SssI) behandelt. Dies führt zu einer vollständigen Methylierung aller CpG-Dinukleotide. Für diese Reaktion wurden folgende Komponenten verwendet:

10 µg	DNA in Aqua dest.
1/10 Vol.	NEBuffer2 (10x)
1/10 Vol.	SAM (1:20)
40 U	M.SssI (4 U/µl)

Nach vorsichtigem Mischen wurde dieser Ansatz für vier Stunden bei 37°C inkubiert und daraufhin 20 Min. einer Temperatur von 65°C ausgesetzt, um eine Inaktivierung des Enzyms zu erreichen. Als nächster Schritt wurde die DNA über Nacht bei -20°C mit 50 µl 3 M Natriumacetat und 750 µl 100%igem Ethanol ausgefällt. Am folgenden Tag schloss sich an die Pelletierung bei 13000 rpm für 10 Min. ein Waschschriff mit 500 µl 70%igem Ethanol und erneuter Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 Min. an. Nach dem Trocknen des DNA-Pellets wurde dieses in 20 µl Aqua dest. gelöst und entweder bei -20°C gelagert oder sogleich verwendet.

4.1.2 Bisulfitkonvertierung

Die Bisulfitkonvertierung wurde erstmalig von Clark et al. [98] im Jahre 1994 als Methode beschrieben, die methylierte von unmethylierter DNA unterscheiden kann. Grundlage dieser Reaktion ist die Behandlung der DNA-Probe mit Natrium-Bisulfit (NaHSO_3). Hierdurch kommt es zur Deaminierung aller unmethylierten Cytosine der DNA nach folgenden Schritten:

- Sulphonierung der unmethylierten Cytosine
- hydrolytische Deaminierung
- Entfernung der Sulphonat-Gruppe durch anschließende Alkali-Behandlung

Als Produkt dieser Reaktionen entsteht aus den unmethylierten Cytosinen jeweils ein Uracil. Da die methylierten Cytosine durch diese Behandlung nicht verändert werden, erreicht man

mit dieser Methode einen DNA-Sequenzunterschied und somit eine klare Unterscheidung von unmethylierten Cytosinen zu 5-Methylcytosinen.

Die Bisulfitkonvertierung wurde mit dem Qiagen EpiTect Bisulfite Kit nach dem zugehörigen Protokoll durchgeführt. Dabei wurden folgende Änderungen vorgenommen: Es wurden 2 µg anstatt 3 µg DNA eingesetzt, Buffer BL ohne carrier-RNA verwendet und die Eluation 2-mal durchgeführt, um die DNA-Ausbeute zu erhöhen

4.1.3 Methylierungsspezifische PCR

Die methylierungsspezifische Polymerasekettenreaktion (MSP) dient dazu, Methylierungen an CpG-Inseln in der DNA zu detektieren und ist für diesen Zweck eine sehr sensitive, einfache und schnelle Methode. Die Grundlage hierfür ist die Bisulfitkonvertierung (siehe 4.1.2) in der alle unmethylierten Cytosine durch die katalytische Wirkung von Bisulfit (HSO_3^-) hydrolytisch zu Uracilen deaminiert werden, im Gegensatz zu den methylierten Cytosinen, die durch das Bisulfit nicht verändert werden.

In dieser PCR wurden je zwei verschiedene Primerpaare verwendet, die spezifisch für methylierte oder unmethylierte bisulfitbehandelte DNA waren. Für *BMP2* wurden drei verschiedene Regionen untersucht, welche sich in CpG-reichen DNA-Abschnitten (CpG-Inseln) befinden. Mit Hilfe des Programms Methyl Primer Express® Software v1.0 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) wurden diese CpG-Inseln unter Verwendung der Parameter von Bird et al. 1986 [99] identifiziert. Dabei sollte der Anteil an Cytosinen und Guanosen über 55 % aller Basen betragen und der Anteil der gefundenen CpG-Dinukleotide im Vergleich mit den zu erwartenden CpGs höher als der Faktor 0,65 sein. Berücksichtigt wurden schließlich nur CpG-Inseln, die eine Länge von mindestens 300 bp und maximal 2000 bp aufwiesen. Bei der Generierung der Primerpaare wurde darauf geachtet, dass jeder Primer mindestens drei CpG-Dinukleotide abdeckt.

Im Folgenden wurden mittels PCR die gewünschten Genabschnitte amplifiziert. Für diese PCR wurden je 3 µl bisulfitkonvertierter DNA vorgelegt und, um einen Gesamtansatz von 20 µl zu erhalten, folgende Komponenten zugegeben:

je Probe:	11,2 µl	Aqua dest.
	2 µl	Hot Start Buffer (10x)
	1,2 µl	MgCl ₂ (25 mM)
	1 µl	Primer forward (M bzw. U) (10 µM)
	1 µl	Primer reverse (M bzw. U) (10 µM)
	0,4 µl	dNTPs (10 mM)
	0,2 µl	Hot Start Taq (5 U/µl)

Folgendes PCR-Programm wurde angewendet:

Erste Denaturierung:	4 Min.	94,0°C
38 Zyklen: Denaturierung:	30 Sek.	94,0°C
Annealing:	30 Sek.	variabel
Elongation:	45 Sek.	72,0°C
Finale Elongation:	10 Min.	72,0°C
Hold		4,0°C

Die Annealingtemperatur variierte dabei je nach Primerpaar (Tabelle 3). Abschließend wurden die Ansätze auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen und anhand der Banden der Methylierungszustand bestimmt.

4.1.4 Bisulfitsequenzierung

Eine genauere Methode, um einzelne methylierte Cytosine in der DNA zu detektieren, ist die Sequenzierung von bisulfitkonvertierter DNA. Zur Definition des zu untersuchenden DNA-Abschnitts wurde der 5'-Bereich einzelner Gene auf CpG-Inseln genauer untersucht. CpG-Inseln wurden hierbei in Anlehnung an Bird *et al.* 1986 [99] definiert und festgelegt (detaillierte Beschreibung unter 4.1.3). Das Programm Methyl Primer Express® Software v1.0 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) wurde dabei zur verbesserten Suche genutzt. Konnten im 5'-Bereich eines Gens eine oder mehrere CpG-Inseln gefunden werden, wurden im Folgenden Primer für die Amplifikation dieses DNA-Abschnittes generiert, die selbst keine CpG-Dinukleotide in ihrer Sequenz aufwiesen, um sicherzustellen, dass ihre spezifische Bindung unabhängig vom Methylierungszustand ist.

Um den gewünschten DNA-Abschnitt zu amplifizieren wurde eine PCR mit bisulfitkonvertierter DNA durchgeführt. Hierfür wurden folgende 40 µl-Ansätze vorbereitet:

für je 1 Probe:	4 µl	bisulfitkonvertierte DNA
	4 µl	Hot Start Buffer (10x)
	2,4 µl	MgCl ₂ (25 mM)
	2 µl	Primer forward (10 µM)
	2 µl	Primer reverse (10 µM)
	0,8 µl	dNTP's (10 mM)
	0,4 µl	Hot Start Taq (5 U/µl)
	24,4 µl	Aqua dest.

Diese Ansätze wurden in folgendem PCR-Programm eingesetzt:

Erste Denaturierung:	4 Min.	94,0°C
45 Zyklen: Denaturierung:	1 Min.	94,0°C
Annealing:	2 Min.	50,0°C
Elongation:	2 Min.	72,0°C
Finale Elongation:	10 Min.	72,0°C
Hold		4,0°C

Um eine Auftrennung der einzelnen DNA-Fragmente zu erreichen, wurde im Anschluss an die PCR eine Gelelektrophorese (siehe 4.3.12) durchgeführt, die Banden, welche der gewünschten Amplikonlänge entsprachen, ausgeschnitten und aus dem Gel extrahiert (siehe 4.3.13). Diese DNA-Abschnitte wurden im nächsten Schritt in einen pCR[®]2.1 Vektor mittels TA-Klonierung ligiert (siehe 4.3.6.1) und in TOP10F' transformiert (siehe 4.3.7). Die folgende Blau-Weiß-Selektion mit X-Gal (siehe 4.3.8) diente dazu, nur die Klone mit kloniertem PCR-Produkt zu erkennen. Die positiven weißen Klone wurden anschließend einzeln weiter vermehrt und die DNA mit Hilfe des QIAGEN Plasmid Mini Kits gewonnen (siehe 4.3.9). Um die klonierten Fragmente auf die richtige Größe zu bewerten, wurde ein Testverdau mit EcoRI durchgeführt (siehe 4.3.10.1), wobei die Schnittstellen dieses Enzyms immer außerhalb der klonierten Sequenz lagen. Zum Abschluss wurden alle Klone mit dem richtigen DNA-Insert, d.h. der passenden Fragmentgröße, von Eurofins MWG Operon, Ebersberg, sequenziert. Hierfür wurden die Proben in folgendem 15 µl-Ansatz vorbereitet:

1,5	µl	M13 fw oder T7 rev Primer (10 µM)
2	µl	Plasmid-DNA (0,5 µg/µl)
11,5	µl	Aqua dest.

Diese Sequenzen wurden abschließend mit den Originalsequenzen aus der Ensembl-Gen-Datenbank (www.ensembl.org) verglichen. Durch die aus der Bisulfitkonvertierung resultierenden Sequenzunterschiede (4.1.2) konnte nachgewiesen werden, welche Cytosine und damit CpG-Dinukleotide ursprünglich methyliert bzw. unmethyliert waren.

4.2 Zellbiologische Methoden

4.2.1 Kultivieren eukaryotischer Zellen

Für die möglichst genaue und vergleichbare Analyse von DNA und RNA des Rhabdomyosarkoms wurden drei verschiedene Zelllinien in Kultur gehalten. Als Vertreter des embryonalen RMS standen humane RD-Zellen, als Vertreter des alveolären RMS die humanen Zelllinien RH30 und RMS13 zur Verfügung.

Die kryokonservierten Zellen wurden rasch bei Raumtemperatur aufgetaut, in je 5 ml Medium mit 10% FCS gegeben und anschließend bei 1200 rpm für 3 Min. abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit je 5 ml frischem Medium (+ 10% FCS + 1% PenStrep) resuspendiert, in eine 5 cm² - Zellkulturflasche gegeben und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Am nächsten Tag wurde das alte Medium durch 5 ml frisches Medium ersetzt, um die abgestorbenen Zellen zu entfernen.

4.2.2 Passagieren eukaryotischer Zellen

Da alle Zelllinien ein sehr gutes Wachstum bei oben genannten Bedingungen aufwiesen, wurden die Zellen regelmäßig (alle 3-4 Tage) bei einer Konfluenz von ca. 90-100% passagiert.

Zuerst wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen mit D-PBS gewaschen. Durch die Zugabe von 1 ml (25 cm²-Kulturflasche) bzw. 0,5 ml (5 cm²-Kulturflasche) Trypsin (25%ige Stocklösung, 1:5 verdünnt mit EDTA) und einer Inkubation für 3 min. bei einer Temperatur von 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen gelöst (falls sich die Zellen schlecht vom Boden der Kulturflasche ablösen, wurde mit einem Zellschaber leicht über den Boden gewischt) und nach Abstoppen der Reaktion mit FCS-haltigem Medium die Zellsuspension je nach Bedarf in 5 cm²- oder 25 cm²-Zellkulturflaschen aufgeteilt und mit entsprechendem frischem Medium aufgefüllt.

4.2.3 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen bei einer Konfluenz von ca. 90-100% abtrypsiniert (siehe 4.2.2) und in einer adäquaten Menge Einfriermedium resuspendiert, aliquotiert und für mindestens 24h bei einer Temperatur von -80°C eingefroren. Die weitere Lagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff.

4.2.4 Behandlung mit 5-Aza-2'-deoxycytidin

Um in den Tumorzellen eine Demethylierung der DNA zu erreichen, wurde das Agens 5-Aza-2'-deoxycytidin (Aza) eingesetzt.

5-Azacytidin wurde erstmals als zytotoxische Substanz für sich teilende Zellen zur Chemotherapie benutzt [100]. Der inhibitorische Effekt auf die DNA-Methylierung von Säuger-Zellen [101] eröffnete schließlich auch die Möglichkeit diese Substanz zu verwenden, um eine Beeinflussung der Expression verschiedener Gene in Tumorzellen zu erreichen. Da Aza eine ähnliche Struktur wie Cytosin aufweist, wird es bei der Replikation in die DNA integriert, blockiert dadurch DNA-Methyltransferasen und führt somit zu einer verminderten Methylierung der DNA.

Das in Pulverform bezogene Aza wurde zunächst in 50 % Essigsäure gelöst (Stock: 50 mM). Für die Behandlung wurden die Rhabdomyosarkomzellen entweder in 5 cm²- oder 25 cm²-Zellflaschen bis zu einer Konfluenz von 70% - 80% kultiviert und dann über fünf Tage einerseits mit 1 µM Aza (1 µl einer 5 mM-Verdünnung in 5 ml Medium) und andererseits als Kontrolle mit dem entsprechenden Volumen an 50%iger Essigsäure behandelt. Das mit Aza bzw. Essigsäure versetzte Medium wurde alle 24 Stunden gewechselt. Nach dieser 5-tägigen Behandlung wurden die Zellen abgeerntet und sowohl DNA als auch RNA (siehe 4.3.1, 4.3.3) gewonnen.

4.2.5 Transiente Transfektion

4.2.5.1 Elektroporation

Das Prinzip dieser Methode ist die Permeabilisierung der Zellmembranen durch Anlegen eines elektrischen Feldes. Dieser Effekt kann ausgenutzt werden, um jegliche Art von DNA, wie zum Beispiel Plasmide in die Zellen einzuschleusen.

Zu 2x10⁶ Zellen in 200 µl Medium wurden je 1 µg pEGFP-Plasmid (bei einer Konzentration von 1,67 µg/µl) zugegeben und die Zellen anschließend zum einen bei 250 V oder 350 V elektroporiert. Nach einer Inkubation von 15 min. bei Raumtemperatur wurden je 30 µl der behandelten Zellen in 6-well-Platten ausplattiert und bei 37°C und 5% CO₂ für 24h, 48h oder 72h inkubiert. Die Transfektionseffizienz wurde durch die Auszählung GFP-exprimierender Zellen an einem Fluoreszenzmikroskop bestimmt und schließlich RNA gewonnen.

4.2.5.2 Lipofektion

Die Lipofektion wurde mit FUGENE® 6 Transfection Reagent durchgeführt und basiert auf Liposomen, welche mit der Zellmembran fusionieren können und damit genetisches Material in die Zelle einbringen. Es wurden die Plasmide pEGFP, pIRES-EGFP, pIRES-EGFP+BMP2, pcDNA3.1, pcDNA3.1+BMP2 und die Zelllinien RD, RH30, RMS13 und HepG2 verwendet. Für diesen Versuch wurden pro Ansatz 7,5 x 10⁵ Zellen/Well über Nacht in 6-well-Platten kultiviert. Die Transfektion gliederte sich wie folgt:

- 3 µl FUGENE® 6 in 100 µl Medium (ohne Zusätze) geben, vorsichtig mischen und für 5 min. bei Raumtemperatur inkubieren
- 1 µg DNA hinzugeben, mischen und für 30 min. bei Raumtemperatur inkubieren
- pro Well je 1,9 ml frisches Medium (mit Zusätzen) vorlegen und vorsichtig je 100 µl des Transfektionsansatzes hinzugeben

Die 6-well-Platten wurden anschließend bei 37°C und 5% CO₂ für 24h oder 48h inkubiert, danach im Fluoreszenzmikroskop wie in 4.2.5.1 bewertet und die RNA gewonnen.

Für den MTT-Proliferationsassay (siehe 4.2.7) wurde dasselbe Transfektionsschema wie bei 4.2.5.2 angewendet, allerdings wurden statt 6-well-Platten 96-well-Platten verwendet.

Pro Well wurden je 5×10^3 Zellen ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Im Folgenden wurden Ansätze mit je 1,9 µl Medium und 100 µl Transfektionsansatz (gesamt 2 ml) hergestellt, gut vermischt, pro Well das alte Medium abgesaugt und je 100 µl des Gesamtansatzes hinzugegeben und schließlich entweder für 0h, 24h, 48h oder 72h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

4.2.6 Behandlung mit rekombinantem BMP2

Eine Rekonstitution von BMP2 in den Rhabdomyosarkomzelllinien wurde unter anderem durch die Zugabe von rekombinantem humanen BMP2 (rhBMP2) erreicht. Das rhBMP2 wurde in 4 mM HCl mit 0,1% BSA gelöst und eine Stocklösung von 100 µg/ml angesetzt. Vor der Behandlung wurden die Zellen für den MTT-Assay in 96-well-Platten ausgesät mit 5×10^3 Zellen/Well, für den Annexin-V-Calcein-Assay und die RNA-Gewinnung in 6-well-Platten mit 5×10^5 Zellen/Well. Nach einer Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ über Nacht wurde jeweils das alte Medium abgesaugt. Es wurden anschließend Ansätze (Medium + entsprechende Menge rhBMP2) mit den Konzentrationen 50 ng/ml, 75 ng/ml, 100 ng/ml und 200 ng/ml rhBMP2 und ein Kontroll-Ansatz mit der entsprechenden Menge Lösungsmittel (HCl + BSA) als Negativkontrolle hergestellt, wobei das Gesamtvolumen von rhBMP2 und Lösungsmittel konstant gehalten wurde.

Bei den 96-well-Platten wurden je 100 µl/Well, bei den 6-well-Platten je 1000 µl/Well des Ansatzes hinzugegeben. Nach Inkubationszeiten von 0h, 24h, 48h oder 72h bei 37°C wurden die behandelten Zellen den entsprechenden Untersuchungsmethoden zugeführt.

4.2.7 Proliferationsassay

Um die Auswirkungen auf die Proliferation nach Reaktivierung von *BMP2* in den Rhabdomyosarkomzellen zu beobachten, wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Unter Verwendung des Cell Proliferation Kit I (MTT) wurde hierzu die Umsetzung von 3-(4,5-

Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) (gelb) zu Formazan (violett) untersucht. Je höher die Umsetzungsrate, umso höher ist die Zellvitalität.

Die 96-well-Platten wurden einerseits nach *BMP2*-Reaktivierung durch transiente Transfektion (siehe 4.2.5) und andererseits nach Behandlung mit rh*BMP2* (siehe 4.2.6) zuerst nach 0h, 24h, 48h oder 72h mit je 10 µl/Well MTT Labeling Reagent versetzt. Nach einer Inkubation von 4h bei 37°C und 5% CO₂ wurde der Versuch mit der Zugabe von je 100 µl/Well Solubilization Buffer fortgesetzt und eine erneute Inkubation über Nacht angeschlossen. Am darauffolgenden Tag wurde im GENios Microplatereader die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Die einzelnen Messungen wurden in Doubletten durchgeführt.

4.2.8 Annexin-V-Calcein-Assay

Neben den Auswirkungen auf die Proliferation der Zellen nach *BMP2*-Reaktivierung durch rh*BMP2*-Behandlung wurden auch die Auswirkungen auf das Apoptoseverhalten mittels einer Annexin-V-Calcein-Färbung untersucht. Durch diese Färbung kann der Anteil an apoptotischen Zellen in der Population der lebenden Zellen bestimmt werden. Vitale Zellen sind Calcein-positiv, wohingegen Zellen in der frühen Apoptose zusätzlich mit Annexin-V angefärbt werden. Annexin-V zeigt eine hohe Affinität zu Phosphatidylserinen, welche in der frühen Phase der Apoptose an der Zelloberfläche präsentiert werden und somit als Bindungspartner für Annexin-V zur Verfügung stehen. Deshalb können diejenigen Zellen, die sowohl eine Calcein-Färbung aufweisen, als auch mit einem fluoreszenzmarkierten Annexin-V-Antikörper markiert sind, als frühapoptotische Zellen detektiert werden.

In 6-well-Platten ausgesät, wurden für RD, RH30 und RMS13 zum einen je ein Well pro Zeitpunkt mit Lösungsmittel (HCl+BSA), zum anderen je ein Well pro Zeitpunkt mit 75ng/ml rh*BMP2* über 24h, 48h und 72h behandelt (siehe 4.2.6). Nach dem gewünschten Behandlungszeitpunkt wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

- Medium abnehmen und mit den danach abtrypsinierten Zellen für 3 min. bei 2000 rpm pelletieren, mit D-PBS waschen und ein weiteres Mal für 3 min. bei 2000 rpm zentrifugieren
- Zellpellet in 500 µl Bindepuffer resuspendieren und 2,5 µl 1mM Calcein AM zugeben, danach Inkubation des Ansatzes für 20 min. bei 37°C
- 5 µl Cy5-Annexin-V-Antikörper zugeben und nach einer weiteren Inkubation von 10 min. bei 37°C, für 3 min. bei 2000 rpm abzentrifugieren
- Zellpellet in 35 µl Zellpuffer resuspendieren und Fluoreszenz im 2100 Bioanalyzer (Programm „Apoptosis fast assay“) messen

Zur Bestimmung der Apoptoserate wurden doppelpositive Zellen (Calcein⁺ und Cy5-AnnV⁺) gegatet und als Anteil an der Gesamtzellzahl ausgedrückt.

4.3 Molekulargenetische Methoden

4.3.1 DNA-Isolation aus adhärennten Zellen und Gewebe

Um aus den in Kultur gehaltenen Zellen DNA zu gewinnen, wurde folgendes Protokoll angewendet:

- Adhärennte Zellen in einer 5 cm²- bzw. 25 cm²-Zellkulturflasche bis zur Konfluenz wachsen lassen, abtrypsinieren und das Zellpellet mit 1 ml D-PBS waschen
- zum Zellpellet 500 µl / 1000 µl STE-Puffer und 30 µl / 50 µl Proteinase K (10 mg/ml) zugeben und über Nacht bei 55°C inkubieren
- 1 Volumen Phenol zugeben und 5 min. per Hand mischen und für 10 min. bei 8000 rpm und 4°C zentrifugieren
- Überstand vorsichtig abnehmen und mit 1 Volumen Chloroform 5 min. per Hand mischen und für 10 min. bei 8000 rpm und 4 °C zentrifugieren
- Überstand in 2,5 ml Ethanol absolut (100 %) geben und vorsichtig mischen
- Fällung der DNA für 5 min. bei Raumtemperatur, danach durch vorsichtiges Schwenken mischen bis DNA-Knäuel sichtbar wird
- DNA vorsichtig mit einer Pipette ansaugen und in 70 %igen Ethanol überführen
- Nach Zentrifugation mit 12000 rpm für 10 Min. bei 4 °C, DNA-Pellet erneut mit 70%igem Ethanol waschen und trocknen lassen
- je nach Größe des Pellets die DNA in 50 – 150 µl Aqua dest. oder TE-Puffer aufnehmen und für 10 min. bei 60°C lösen

Um die DNA aus Muskel- und Tumorgewebe zu gewinnen wurde das gleiche Schema angewendet, nur wurden die ersten beiden Schritte durch folgenden ersetzt:

- Kleines Stück Gewebe (ca. 5 mm³) durch Zugabe von 1 ml STE-Puffer und 100 µl Proteinase K über Nacht bei 55 °C lysieren

Nach Bestimmung der Konzentration der gelösten DNA mit Hilfe eines BioPhotometers wurde diese entweder weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert.

4.3.2 DNA-Isolierung aus humanem Blut

Die Isolierung genomischer DNA wurde aus 14 ml Vollblut einer gesunden Kontrollperson unter Zuhilfenahme des FlexiGene DNA Kit nach Herstellerangaben durchgeführt und die Konzentration anschließend mit einem BioPhotometer gemessen.

4.3.3 RNA-Isolation aus adhärenenten Zellen und Gewebe

Als Vorbereitung für die RNA-Isolation aus Muskel- und Tumorgewebe wurden ca. 200 mg große Proben (Kantenlänge von ca. 10 mm) zuerst grob mit einem Skalpell zerkleinert und anschließend in 2 ml Tri Reagent® mit dem Homogenisator Miccra homogenisiert, für die RNA-Isolation aus adhärenenten Zellen wurden die Zellen mit 2 ml Tri Reagent® direkt in der Zellkulturschale lysiert.

Anschließend wurden die Lysate auf je zwei Ansätze aufgeteilt und nach folgenden Schritten weiter vorgegangen:

- Je 0,4 ml Chloroform zugeben, für 15 sec. vortexen und nach einer Inkubation von 3 min. bei Raumtemperatur die Ansätze für 15 min. bei 12000 rpm und 4 °C zentrifugieren
- Die obere klare, wässrige Phase vorsichtig abnehmen, mit je 1 Volumen Isopropanol mischen und nach einer Inkubation von 10 min. bei Raumtemperatur für 15 min. bei 12000 rpm und 4 °C zentrifugieren
- Den Überstand verwerfen und das RNA-Pellet mit 1,5 ml gekühltem 70% Ethanol durch Vortexen und anschließender Zentrifugation für 5 min. bei 7500 rpm und 4°C waschen
- Den Überstand erneut verwerfen, das Pellet lufttrocknen lassen und anschließend für 15 min. bei 55°C in 50 µl Aqua dest. lösen

Die RNA-Konzentration wurde anschließend mit Hilfe eines BioPhotometers bestimmt.

Um verbleibende DNA-Reste zu beseitigen, wurde ein DNase-Verdau mit Hilfe des RNeasy® Mini Kits und des RNase-Free DNase Sets nach folgenden Schritten durchgeführt:

- maximal 100 µg RNA mit DNase/RNase-freiem Aqua dest. auf insgesamt ein Volumen von 100 µl auffüllen
- Mischen des Ansatzes mit 350 µl RLT-Puffer (in einem Verhältnis von 1:10 mit β-Mercaptoethanol versetzt)
- erneutes Mischen des Ansatz nach Zugabe von 250 µl 100% Ethanol, danach auf eine RNeasy-Säule geben und für 15 sec. bei 8000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugieren
- 350 µl RW1-Puffer auf die Säule geben und bei Raumtemperatur für 15 sec. bei 8000 rpm zentrifugieren
- 10 µl DNase-Lösung (1500 Kunitz units) mit 70 µl RDD-Puffer durch vorsichtiges Invertieren mischen, die kompletten 80 µl direkt auf die Silicalgelmembran geben und für 15 min. bei Raumtemperatur inkubieren

- erneut 350 µl RW1-Puffer zugeben und für 15 sec. bei 8000 rpm und Raumtemperatur zentrifugieren
- Durchfluss verwerfen, 500 µl RPE-Puffer zugeben und bei 8000 rpm und Raumtemperatur für 2 min. zentrifugieren
- Durchfluss verwerfen und erneut bei 12000 rpm und Raumtemperatur für 1 min. zentrifugieren
- Eluierung der RNA durch Zugabe von 30 µl DNase/RNase-freiem Aqua dest., Inkubation für 1 min. bei Raumtemperatur und Zentrifugation mit 8000 rpm für 1 min.. Wiederholung dieses Schrittes, um verbliebene RNA zu lösen.

Nach Bestimmung der RNA-Konzentration mit Hilfe eines BioPhotometers wurden die Proben entweder sogleich weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert.

4.3.4 cDNA-Synthese

Um cDNA mittels reverser Transkription aus mRNA herzustellen, wurde folgendes Protokoll angewendet:

- 2 µg DNase-verdaute und aufgereinigte RNA mit DNase/RNase-freiem Aqua dest. auf 7 µl Gesamtvolumen auffüllen, 5 µl „random“ Primer (20 ng/µl) hinzugeben und für 10 min. bei 70°C inkubieren
- Zugabe von 4 µl 5x1st Strand Buffer, 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl 10 mM dNTPs und Gesamtansatz für 10 min. bei Raumtemperatur inkubieren
- Nach einer Inkubation von 2 min. bei 42°C, 1 µl SuperScript® II (200 U/µl) zugeben, durch vorsichtiges Pipettieren mischen für 1h bei 42°C inkubieren
- Inkubation von 10 min. bei 70°C zur Inaktivierung von SuperScript® II
- Verbleibende RNA durch Zugabe von 1 µl RNase H (1 U/µl) für 20 min bei 37°C verdauen
- Ansatz mit 79 µl DNase/RNase-freiem Aqua dest. auffüllen, um eine Endkonzentration der cDNA von 20 ng/µl zu erhalten

Die cDNA wurde anschließend direkt für weitere Versuche verwendet oder bei -20°C gelagert.

4.3.5 Quantitative *real-time* PCR

Mit Hilfe der sogenannten quantitativen *real-time* PCR (Q-PCR) wurden Expressionsanalysen verschiedener Gene auf RNA-Ebene durchgeführt. Hierzu wurde nach Vorlage von 2 µl cDNA (Konzentration 20 ng/µl) für jede zu untersuchende Probe je Gen in 2 Wells einer 96-Well-PCR-Platte folgender Ansatz hergestellt:

10 µl	2x iTaq SYBR-Green Supermix with ROX
1 µl	Primer forward (10 µM)
1 µl	Primer reverse (10 µM)
6 µl	Aqua dest.

Die PCR wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Erste Denaturierung:	2 min.	95°C
40 Zyklen:	Denaturierung:	15 sec. 95°C
	Hybridisierung:	15 sec. 55°C
	Elongation:	20 sec. 68°C
Schmelzkurve:	15 sec.	95°C
	20 min.	55 – 95°C
	15 sec.	95°C
Hold:		4°C

Eine Analyse der Spezifität der Primerbindung wurde durch die entsprechenden Schmelzkurven ermöglicht. Die zusätzliche Messung der Expression des Haushaltsgens *TATA-Box-Binding Protein (TBP)* diente zur Normierung der einzelnen Werte. Die zu *TBP* relative Expression wurde anhand folgender Gleichung nach Paffl *et al.* 2001 [102] berechnet:

$$\text{Expression relativ zu Referenzgen} = 2^{-[\text{Ct zu untersuchendes Gen} - \text{Ct TBP}]}$$

4.3.6 Klonierung

4.3.6.1 TA-Klonierung

Zur Amplifikation von PCR-Produkten in *E. coli* im Rahmen der Bisulfidsequenzierung wurden diese in Plasmidvektoren unter Zuhilfenahme des TA Cloning® Kits (mit pCR®2.1 Vektor) kloniert. Die Tatsache, dass die Taq Polymerase unspezifisch ein Adenosin an das 3'-Ende jedes Strangs des PCR-Produkts anhängt, macht man sich zu Nutze, da dies eine Bindung an 3' Thymidin-Reste des linearisierten pCR®2.1-Vektors ermöglicht. Das gewünschte DNA-Fragment wurde hierfür zunächst über eine Gelelektrophorese-Extraktion (siehe 4.3.12) aufgereinigt und anschließend in folgendem Ligationsansatz über Nacht bei 14°C inkubiert:

6 µl	DNA (100 ng/µl)
2 µl	Ligation Buffer (5x)
1 µl	T4 DNA Ligase (5 Weiss units/µl)
2 µl	pCR®2.1-Vektor (25 ng/µl)

Das Ligationsprodukt wurde anschließend zur Transformation weiterverwendet oder bei -20°C gelagert.

4.3.6.2 Klonierung in Expressionsplasmide

Um eine Reaktivierung von *BMP2* in den Rhabdomyosarkomzelllinien zu erreichen, wurde unter anderem eine transiente Transfektion durchgeführt. Da für diese Transfektion ein Expressionsplasmid für *BMP2* benötigt wurde, wurde dieses zum einen aus pGEM-Teasy+BMP2 (Prof. Dr. Beuschlein, Medizinische Klinik, LMU München) und pIRES-EGFP und zum anderen aus pIRES-EGFP+BMP2 und pcDNA3.1 hergestellt. Die Klonierung von pIRES-EGFP+BMP2 gliederte sich wie folgt:

Durch einen Restriktionsenzymverdau (siehe 4.3.10.1) mit *EcoRI* konnte sowohl die Sequenz von *BMP2* aus dem Vektor pGEM-Teasy+BMP2 gewonnen, als auch der Vektor pIRES-EGFP linearisiert werden. Da in beiden Fällen das gleiche Restriktionsenzym Anwendung fand, passten die Enden der *BMP2*-Sequenz zu den Enden der Insertionsstelle von pIRES-EGFP.

Als nächster Schritt wurde der Restriktionsverdau mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe 4.3.12) und die entsprechenden Banden für die *BMP2*-Sequenz (1,2 kb) und für pIRES-EGFP (5,3 kb) extrahiert (siehe 4.3.13).

Daraufhin wurde die für *BMP2* kodierende Sequenz in den linearisierten Vektor pIRES-EGFP mit folgendem Ansatz über Nacht bei 14°C ligiert:

6 µl	BMP2 kodierende DNA (100 ng/µl)
2 µl	linearisierter Vektor pIRES-EGFP
1 µl	T4 DNA Ligase (5 Weiss units/µl)
1 µl	Ligation Buffer (10x)

Die Klonierung von pcDNA3.1+BMP2 (5,4 kbp) aus pIRES-EGFP+BMP2 erfolgte nach demselben Schema.

4.3.7 Transformation von Ligationsansätzen in *E.coli*

Die Transformation von Plasmiden in *E.coli* wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Für jeden Ansatz ein 50 µl-Aliquot kompetenter *E.coli* Top10F' auf Eis auftauen und 4 µl des Ligationsansatzes hinzu pipettieren
- Inkubation des Transformationsansatzes zuerst für 30 min. auf Eis und danach für 90 sec. Hitzeschock bei 42°C mit anschließender erneuter Inkubation für 5 min. auf Eis

- Ansatz in 2 ml vorgewärmtes LB-Medium (ohne Antibiotikum) überführen und für 2 h bei 37°C inkubieren
- 100 µl des Transformationsansatzes auf eine LB-Platte (im Verhältnis 1:1000 mit Antibiotikum der Konzentration 50 mg/ml versetzt) ausplattieren, kurz trocknen lassen und dann die Platten über Nacht bei 37°C über Kopf inkubieren

Die Lagerung der restlichen Flüssigkultur erfolgte bei 4°C für maximal einen Monat. Nach erneutem Schütteln von ca. einer Stunde bei 37°C konnte diese wieder verwendet werden. Klone konnten noch ca. drei Monate nach Transformation von den LB-Platten, welche auch bei 4°C gelagert wurden, geerntet und kultiviert werden.

4.3.8 Blau-Weiß-Selektion

Zum Nachweis einer erfolgreichen Klonierung wurde die sogenannte Blau-Weiß-Selektion durchgeführt. Der Vektor pCR[®]2.1, der für die Klonierung (siehe 4.3.6.1) verwendet wurde, enthält ein lacZ α -Gen, welches für die β -Galaktosidase kodiert. Wird das gewünschte DNA-Insert in den linearisierten Vektor erfolgreich ligiert, wird der Leserahmen für das lacZ α -Gen unterbrochen und das Enzym kann nicht exprimiert werden. Falls das Insert nicht in den Vektor integriert werden konnte, kommt es zu einer Religation des Vektors, damit zu einem vollständigen lacZ α -Gen und der Expression der β -Galaktosidase. Eine Unterscheidung beider Zustände kann mit Hilfe des β -Galaktosidase-Substrats X-Gal erreicht werden. Wird die β -Galaktosidase kodiert, kann Galaktose umgesetzt werden, was zu einem blauen Farbumschlag der entsprechenden Bakterienkolonie führt, wohingegen die Klone mit erfolgreicher Ligation des Inserts in den Vektor, X-Gal nicht spalten können, somit auch der Farbumschlag ausbleibt und die Kolonie weiß erscheint.

Vor dem Ausplattieren des Transformationsansatzes auf die mit Antibiotikum versetzten LB-Platten wurde, um die gewünschte Blau-Weiß-Selektion zu erreichen, auf diese 40 µl X-Gal (20 mg/ml in Dimethylformamid) ausgestrichen. Dementsprechend wurden die weißen Klone gepickt und weiter kultiviert (siehe 4.3.9).

4.3.9 Präparation von Plasmid-DNA

Um Plasmid-DNA zu vermehren und zu gewinnen, wurden *E. coli*-Zellen transformiert (siehe 4.3.7), selektioniert (siehe 4.3.7) und anschließend in LB-Medium vermehrt. Das LB-Medium wurde zuvor entsprechend der Antibiotikaresistenz des zu gewinnenden Plasmids 1:1000 mit einer Stammlösung von 50 mg/ml Ampicillin bzw. 50 mg/ml Kanamycin versetzt.

Die Plasmid Midi Präparationen gliederte sich wie folgt:

- Inkubation von 5 ml Vorkultur (= 5 ml LB-Medium + 5 µl Antibiotikum + ein transformierter Klon) für ca. 3-4 Stunden im Schüttelinkubator bei 37 °C, 200 rpm

- Zugabe von 2 ml der Vorkultur zu 100 ml LB-Medium und über Nacht bei 37 °C in den Schüttelinkubator stellen

Die weiteren Schritte wurden nach den Angaben des Plasmid Midi Kits durchgeführt.

Bei den Plasmid Mini Präparationen wurde 5 ml des mit einem Klon beimpften LB-Medium (+ Antibiotikum) über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Weiterverarbeitung der Bakterienkultur erfolgte am nächsten Tag nach den Angaben des Plasmid Mini Kits.

4.3.10 Restriktionsverdau

4.3.10.1 EcoRI-Restriktionsverdau

Es wurde, zum einen zur Kontrolle der TA-Klonierung, zum anderen für die Klonierung eines Expressionsplasmids (siehe 4.3.6), ein Verdau mit dem Restriktionsenzym EcoRI durchgeführt. EcoRI schneidet bei allen vier verwendeten Plasmiden (pCR[®]2.1, pGEM-Teasy, pIRES-EGFP und pcDNA3.1) kurz vor und nach der multi-cloning-site des Plasmids. Dadurch entstehen zum einen bei der TA-Klonierung nach einer erfolgreichen Ligation des DNA-Fragments in den Vektor nach Verdau zwei verschieden große Fragmente, was zum Nachweis der erfolgreichen Ligation dient. Das größere Fragment hat wie der leere pCR[®]2.1-Vektor eine Größe von ca. 3,9 kb, das zweite gleicht bis auf nur wenige Basen der Größe des ligierten PCR-Produkts.

Zum anderen konnten durch diesen Verdau die gewünschte BMP2-Sequenz aus pGEMTeasy+BMP2 und pIRES+BMP2 geschnitten, die Expressionsplasmide linearisiert und damit deren Klonierung ermöglicht werden.

Nach Amplifikation der Plasmid-DNA und anschließender Plasmid Mini Präparation (siehe 4.3.9) wurde für den Restriktionsverdau der TA-Klonierung der folgende Restriktionssatz zwei Stunden bei 37 °C inkubiert:

1	µg	Plasmid-DNA
2	µl	<i>EcoRI</i> Buffer (10x)
2	µl	<i>EcoRI</i> (10 U/µl)
14	µl	Aqua dest.

Dieser Verdau wurde abschließend, nach Inaktivierung des Restriktionsenzym für 20 min. bei 65 °C, mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 4.3.12) ausgewertet.

Für den Verdau zur Klonierung der Expressionsplasmide wurde folgender Restriktionsansatz zwei Stunden bei 37°C inkubiert:

5 µg Plasmid DNA
2 µl *EcoRI* Buffer (10x)
2 µl *EcoRI* (10 U/µl)
mit Aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 20 µl auffüllen

Um eine Religation des nun linearisierten Plasmides zu vermeiden, wurde an diesen Verdau eine Behandlung mit *SAP* (*shrimp alkaline phosphatase*) angeschlossen und somit die folgende Klonierung der Expressionsplasmide optimiert.

4.3.10.2 Sma I – Restriktionsverdau

Nach der Klonierung der für BMP2 kodierenden Sequenz in pIRES-EGFP musste überprüft werden, ob die Sequenz einerseits komplett und andererseits in der 5'→3'-Orientierung in den Vektor kloniert wurde. Dies konnte durch einen Verdau mit dem Restriktionsenzym *Sma I* erreicht werden. Da *Sma I* sowohl in der *BMP2*-Sequenz als auch an einer Stelle der multiple-cloning-site von pIRES-EGFP schneidet, konnten durch diesen Verdau zwei verschieden große Fragmente produziert werden. Bei vollständiger und richtig orientierter Ligation sollte hierbei das eine Fragment 566 bp und das andere 6289 bp groß sein, wohingegen bei falsch orientierter Ligation ein Fragment von 1049 bp und ein zweites von 5806 bp entstehen sollte. Für diesen Verdau wurde das Enzym Fast Digest™ *Sma I* nach folgendem 20 µl-Ansatz verwendet:

1 µg Plasmid-DNA
2 µl Fast Digest Buffer (10x)
1 µl Fast Digest™ *Sma I* (200 µl für 200 Reaktionen)
mit Aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 20 µl auffüllen

Dieser Ansatz wurde nach einer Inkubation von 5 min. bei 37°C und der Inaktivierung des Enzyms bei 65°C für weitere 5 min. mittels einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die verschiedenen Fragmentgrößen analysiert.

Dasjenige Plasmid mit vollständig ligierter und richtig orientierter DNA-Sequenz wurde in späteren Versuchen weiter verwendet.

4.3.10.3 Sma I/Hind III – Restriktionsverdau

Um die Klonierung von BMP2 in pcDNA3.1 zu überprüfen, wurde neben dem Enzym *Sma I* auch noch *HindIII* mitverwendet. Bei richtig orientierter und vollständiger Ligation ergaben sich Fragmente von 1050 bp und 5,5 kb, bei falsch orientierter Ligation von 600 bp und 6 kb. Hierfür wurde folgender Ansatz für 2h bei 37°C inkubiert:

2 µg Plasmid-DNA
 4 µl Buffer 1x Tango
 2 µl Fast Digest™ *Sma*I (200 µl für 200 Reaktionen)
 2 µl *Hind*III (10 U/µl)
 30 µl Aqua dest.

Anschließend wurden die Enzyme für 20 min. bei 65°C inaktiviert, die Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die verschiedenen Fragmentgrößen analysiert.

4.3.11 Ortsspezifische *in-vitro* Mutagenese

Nach erfolgreicher Klonierung des Plasmids pIRES-EGFP+BMP2 wurde zur Sequenzkontrolle eine direkte Sequenzierung der ligierten DNA durch Eurofins MWG Operon, Ebersberg, durchgeführt. Die Sequenz wurde mit der Originalsequenz aus der Ensembl-Gen-Datenbank (www.ensembl.org) verglichen und es stellte sich heraus, dass die klonierte BMP2-Sequenz zwei Mutationen aufwies. Die erste Mutation, von Cytosin zu Thymin, betraf Position 312 der kodierenden Sequenz, führte aber zu keiner Aminosäurenänderung. Da die zweite Mutation, der Ersatz von Thymin durch Cytosin an Position 973, auch die Aminosäuresequenz verändert hätte, wurde als nächster Schritt der Basenaustausch von Cytosin zurück zu Thymin mittels des QuickChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit durchgeführt.

Zuerst wurde ein Primerpaar nach den Richtlinien des Herstellers entworfen, welches sich über die mutierte Stelle an Position 973 erstreckte, anstatt der mutierten Base allerdings die Originalsequenz aufwies (Tabelle 6). Mit diesen Primern wurde daraufhin eine PCR mit 20 ng der Plasmid-DNA pIRES-EGFP+BMP2 nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Nach dem Verdau der Ausgangs-DNA mit *Dpn*I und damit Selektionierung der neu synthetisierten DNA wurde diese in XL1-Blue Supercompetent Cells nach Angaben des Herstellers transformiert, somit vermehrt und schließlich mittels QIAGEN Plasmid Mini Kit (siehe 4.3.9) wieder gewonnen und aufgereinigt. Zur Bestätigung des erfolgreich durchgeführten Basenaustausches wurde danach erneut die direkte Sequenzierung der ligierten DNA durchgeführt. Dieses neue pIRES-EGFP+BMP2-Plasmid, nun mit der kompletten und richtigen BMP2-Sequenz, wurde für alle weiteren Proliferations- und Apoptoseversuche verwendet.

4.3.12 Agarose-Gelelektrophorese

Um DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierzu wurden 0,8 - 2%ige Agarose-TBE-Gele, je nach Größe der DNA-

Fragmente, hergestellt, welche mit 0,25 µg/ml Ethidiumbromid versetzt wurden. Für Fragmentgrößen um die 6 kb wurden 0,8 %ige Gele, für Größen < 200 bp eher 1,5 - 2%ige Gele verwendet. Zu den DNA-Proben wurden je 6x Loading Dye Solution gegeben und zusätzlich auf den Gelen ein Größenstandard aufgetragen.

Unter Anlegung einer konstanten Spannung von 90 V für 30 - 60 min. an die horizontal in TBE-Puffer gelagerten Gele wurde die Auftrennung der verschiedenen Fragmente erreicht. Die Analyse der DNA-Fragmente erfolgte mittels UV-Licht in einem Gel Jet Imager.

4.3.13 Agarose-Gelextraktion

Für die Extraktion der aufgetrennten DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurde der QIAquick Gel Extraction Kit verwendet. Nachdem die Bande der gewünschten Fragmentgröße mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten wurde, folgte die DNA-Extraktion gemäß den Angaben des Herstellers.

5 Ergebnisse

5.1 Identifizierung epigenetisch regulierter Gene des RMS

Von vielen Tumoren ist bekannt, dass es über epigenetische Mechanismen, wie der Hypermethylierung von Promotorbereichen verschiedenster Gene, zu einer Herabregulierung speziell von Tumorsuppressorgenen kommen kann und dadurch das Tumorwachstum entscheidend mitbegünstigt wird [34, 58]. Da außer dem Gen *RASSF1A*, welches im RMS über Methylierung dereguliert ist [4], beim RMS noch äußerst wenig über epigenetisch regulierte Gene bekannt ist, war das erste Ziel weitere Gene beim RMS zu finden, die in ihren Promotorbereichen hypermethyliert sind und sich durch Demethylierung reaktivieren lassen.

Die drei verschiedenen Zelllinien, RD, als Vertreter des embryonalen RMS, sowie RH30 und RMS13, als Vertreter des alveolären RMS, wurden hierfür zuerst über 5 Tage einerseits mit 1 μM des demethylierenden Agens 5-Aza-2'-deoxycytidin (Aza) und andererseits als Kontrolle mit dem Lösungsmittel 1 μM Essigsäure (solvent) behandelt. Anschließend wurde die mRNA isoliert und mittels quantitativer real-time PCR (Q-PCR) mögliche Expressionsänderungen von 92 Genen (Abbildung 4 a), die in verschiedenen embryonalen Signalwegen eine Rolle spielen, untersucht.

(a)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	GLI1	GLI2	GLI3	PTCH1	PTCH2	SHH	BCL2	MYCN	SPP1	IGF2	FOXA2	FOXF1
B	FZD1	FZD2	TCF7	LEF1	WIF1	WISP1	DKK1	PLAG1	TWIST1	SNAI1	SNAI2	WNT5A
C	TGFB1	TGFB2	TGFB3	TGFBR1	TGFBR2	TGFBR3	TGIF	BMP2	BMP4	SMURF1	SMAD3	SMAD5
D	NOTCH1	NOTCH2	DLL1	DLK1	JAG1	JAG2	DTX1	PSEN1	PSEN2	LFNG	NLMB	HES1
E	TP53	TP53I3	MDM2	IGFBP3	GADD45A	BAX	AKT1	AKT3	IRS1	IRS2	BAD	BID
F	MYC	CTNNB1	AXIN1	AXIN2	DKK2	DVL1	DVL2	CDH1	IHH	SMO	SUFU	HHIP
G	CCNB1	CCND1	CCND2	CDK2	CDK4	CDKN1A	CDKN1B	CDKN1C	CDKN2A	CDKN2B	RB1	SPRY2
H	IGF1	IGF1R	PDGFRA	BMI-1	BIRC5	EZH2	SOCS1	RASSF1A	TBP	TBP	NTC	NTC

(b)

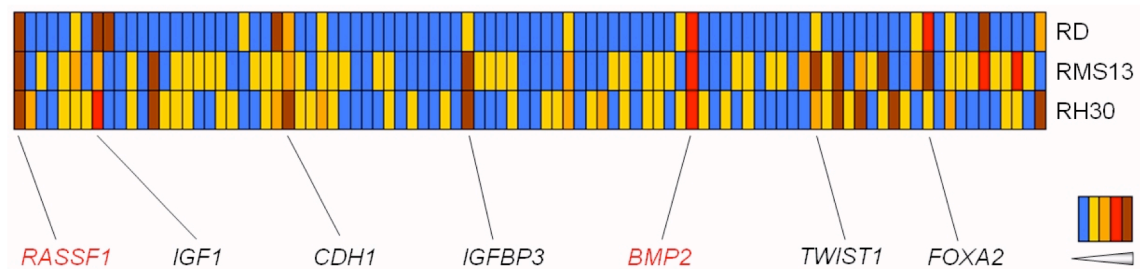


Abbildung 4: Kandidatengen-Identifizierung mittels Pathway Finder Assay

(a) Belegung der für die Genidentifizierung eingesetzten Pathway Finder - Mikrotiterplatte (NTC: no template control, TBP: *TATA-box binding protein*; zur Normalisierung eingesetztes House Keeping Gen) (b) Expressionsanstieg der untersuchten Gene nach Behandlung der Zellen über 5 Tage mit 1 μ M Aza im Vergleich zu 1 μ M Essigsäure (blau: kein oder geringer Expressionsanstieg, braun: großer Expressionsanstieg)

Sind Gene durch DNA-Methylierung in der Promotorregion herabreguliert, bewirkt die Behandlung mit Aza durch indirekte Demethylierung eine Reexpression dieser Gene bzw. eine erhöhte Genexpression im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Durch dieses „Screening“ auf epigenetisch regulierte Gene konnte zum einen eine starke Reaktivierung von *RASSF1A* in allen drei Zelllinien, wie schon von Harada et al. 2002 [4] beschrieben wurde, erreicht werden. Zum anderen zeigten sich auch Reaktivierungen verschiedener anderer Gene, unter welchen *BMP2* den stärksten Expressionsanstieg aufweisen konnte (Abbildung 4 b). Weitere Gene, die zumindest in 2 RMS-Zelllinien induziert wurden, waren *IGF1*, *CDH1*, *IGFBP3*, *TWIST1* und *FOXA2*.

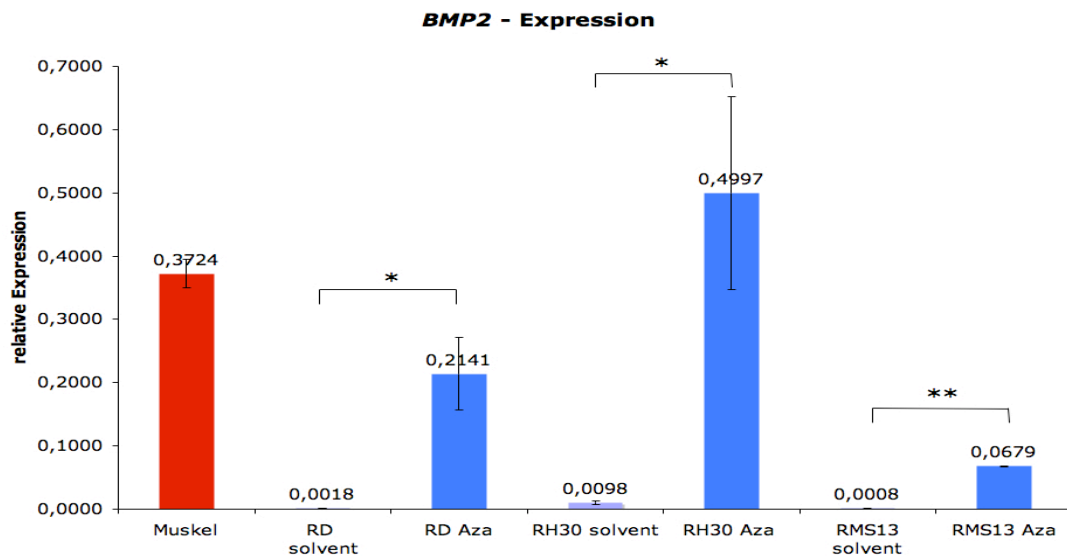
5.2 Reaktivierung von BMP2 und RASSF1A durch Demethylierung

Da *BMP2* neben *RASSF1A* das am stärksten reaktivierte Gen darstellte und es erste Hinweise auf eine epigenetische Regulierung von *BMP2* gibt [97], wurden alle weiteren Versuche vollständig auf *BMP2* ausgerichtet. Neben dem eher groben „Screening“-Assay sollte nun die Reaktivierung speziell für *BMP2* und *RASSF1A* verifiziert werden. Hierfür wurde erneut die mRNA der drei RMS-Zelllinien nach 5-tägiger Aza-Behandlung verwendet und zusätzlich, um die Expression der beiden Gene in Normalgewebe als Vergleich zu erhalten, mRNA aus gesundem Muskelgewebe isoliert und daraufhin alle insgesamt 7 verschiedenen mRNA-Proben mittels Q-PCR analysiert.

Sowohl für *BMP2* als auch für *RASSF1A* zeigte sich, dass die Expression relativ zu dem Haushaltsgen *TATA-box binding protein (TBP)* beider Gene im unbehandelten Zustand nahezu null war (Abbildung 5). Nach der Behandlung mit Aza konnte bei allen drei Zelllinien ein starker Anstieg der relativen Expression (um das 50-100 fache) für beide Gene verzeichnet werden. Der Unterschied der relativen Expression von unbehandelten Zellen zu behandelten Zellen war hierbei signifikant bis hoch signifikant. Das Expressionslevel von *BMP2* in gesundem Muskelgewebe lag auf dem gemittelten Expressionsniveau der reaktivierten Zelllinien. Ähnliche Ergebnisse in gesundem Muskelgewebe konnten für *RASSF1A* verzeichnet werden. Die relative Expression entsprach auch hier im Mittel Werten der relativen Expression der Zelllinien nach Aza-Behandlung (Abbildung 5).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sowohl *BMP2* als auch *RASSF1A* in gesundem Muskelgewebe exprimiert wird, wohingegen in den RMS-Zelllinien keine Expression auf mRNA-Level vorhanden ist, durch die Behandlung mit Aza allerdings eine Reaktivierung auf Normalniveau erzielt werden kann.

(a)



(b)

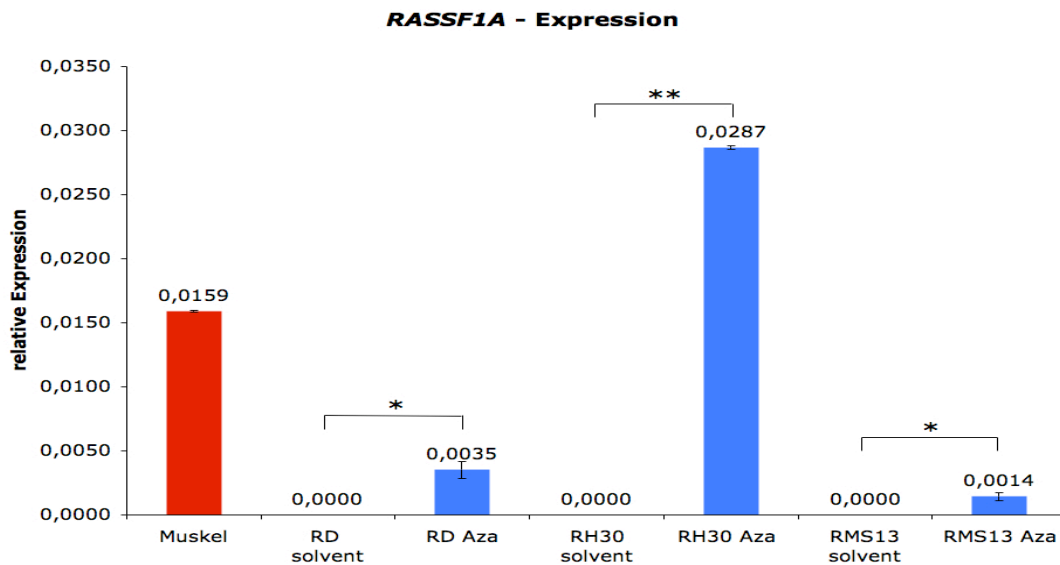


Abbildung 5: Expression von *BMP2* und *RASSF1A* in RMS-Zelllinien nach Aza-Behandlung bzw. mit Lösungsmittel

Dargestellt ist die zu dem Haushaltsgen *TATA-Box-Binding Protein (TBP)* relative Expression von *BMP2* (a) und *RASSF1A* (b), zum einen nach Behandlung der Zelllinien RD, RH30 und RMS13 mit 1 μ M Aza bzw. dem Lösungsmittel (solvent), zum anderen in gesundem Muskelgewebe. *: t-Test < 0,05; **: t-Test < 0,01.

5.3 Nachweis von BMP2 und dessen Rezeptoren

Um zu zeigen, dass der *BMP2*-Signalweg dennoch intakt ist und *BMP2*, falls es reaktiviert wird, seine Wirkung entfalten kann, wurden die dazugehörigen Rezeptoren *BMPR1A*, *BMPR1B* und *BMPR2* in den drei unbehandelten Zelllinien mittels RT-PCR und anschließender Gelelektrophorese nachgewiesen. Alle drei Rezeptorkomponenten wiesen sowohl in Muskelgewebe, als auch den drei verschiedenen Zelllinien starke Banden in der Elektrophorese und hohe Expressionen relativ zu *TBP* auf (Abbildung 6). Somit ist folglich die Oligomerisierung des *BMP2*-Rezeptors möglich und damit auch die Aktivierung des Signalweges durch *BMP2*. Der geleelektrophoretische Nachweis von *BMP2* in den drei Zelllinien bestätigte hingegen die im Gegensatz zu gesundem Muskelgewebe nur sehr geringe Expression (Abbildung 6).

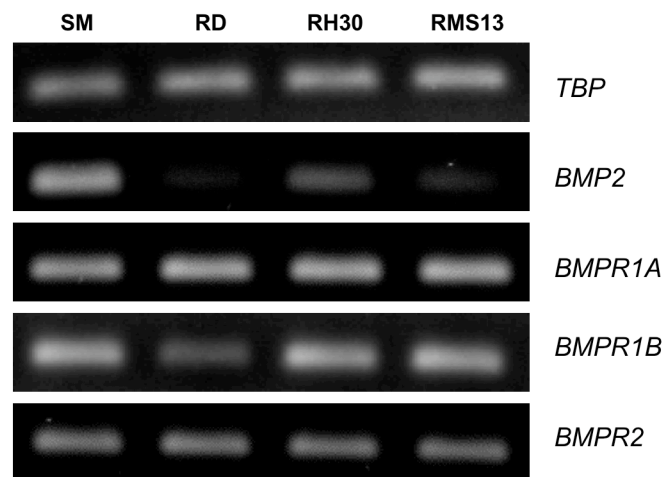


Abbildung 6: Nachweis von *BMP2* und seinen Rezeptoren in gesundem Muskelgewebe und den RMS-Zelllinien mittels Gelelektrophorese

Hier abgebildet ist die Gelelektrophorese mit den Produkten der RT-PCR zum Nachweis von *BMP2*, den dazugehörigen Rezeptorkomponenten *BMPR1A*, *BMPR1B* und *BMPR2* und dem Haushaltsgen *TATA-box binding protein (TBP)* in Skelettmuskel (SM) und den drei RMS-Zelllinien RD, RH30 und RMS13.

5.4 Bestimmung des Methylierungsstatus von BMP2

5.4.1 Methylierungsanalyse mittels Bisulfitsequenzierung

Um die epigenetische Regulierung von *BMP2* genauer zu untersuchen, wurde als nächster Schritt der Methylierungsstatus aller drei RMS-Zelllinien bestimmt. Hierfür wurde eine Bisulfitsequenzierung des Promotorbereichs von *BMP2*, einmal für unbehandelte Zellen und einmal für Zellen, die mit Aza behandelt wurden, durchgeführt. Die Primer wurden so in den Promotorbereich von *BMP2* gelegt, dass insgesamt ein Bereich von 493 bp abgedeckt wurde, in welchem sich 50 CpG-Dinukleotide befanden (Abbildung 7).

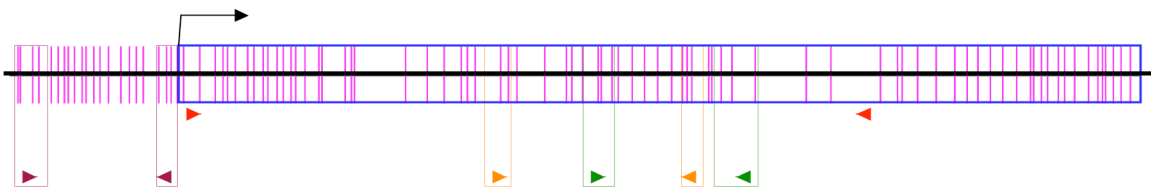


Abbildung 7: Lage der Primer für Bisulfitsequenzierung und methylspezifische PCR (MSP) im Promotorbereich von *BMP2*

Schematisch dargestellt ist hier die Lage der Primer sowohl für die Bisulfitsequenzierung, als auch für die MSP und deren beinhaltete CpG (pinke Striche). Lila Markierung entspricht der MSP Nr.1, orange Markierung der MSP Nr. 2, grüne Markierung der MSP gemäß Wen et al. [97] und rote Markierung der Bisulfitsequenzierung. Die blaue Umrandung kennzeichnet das Exon 1, der schwarze Pfeil den Transkriptionsstart.

Als Positivkontrolle für Methylierung wurde SssI-behandelte DNA (siehe 4.1.1), welche nahezu 100% methyliert sein sollte, als Negativkontrolle genomische DNA aus dem Blut eines gesunden Probanden verwendet. Dies konnte auch in der Bisulfitsequenzierung gezeigt werden (Abbildung 8).

Im unbehandelten Zustand, d.h. nur mit Lösungsmittel behandelt, zeigten die alveolären Zelllinien RH30 und RMS13 eine fast 100%ige Methylierung dieser 50 untersuchten CpGs, wohingegen bei der Zelllinie RD ein Methylierungsgrad von nur 20% erreicht wurde. Nach Behandlung mit Aza konnte bei den RD-Zellen keine nennenswerte Demethylierung, bei RMS13 nur um 10% erreicht werden. Die Demethylierung bei den RH30-Zellen hingegen war sehr deutlich, was in einer Reduzierung des Methylierungsgrades auf 56% resultierte (Abbildung 8).

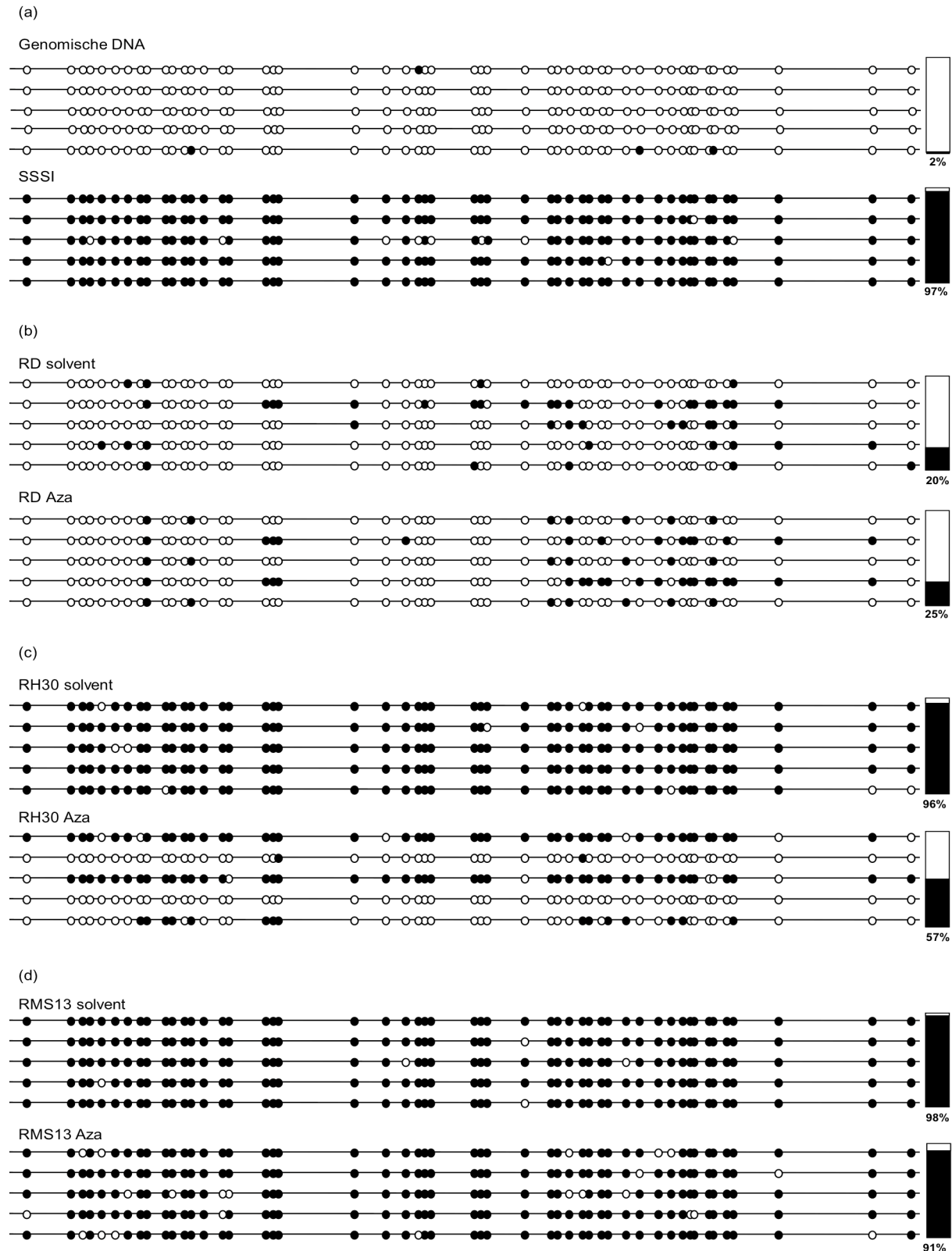


Abbildung 8: Bisulfitequenzierung des Promotorbereichs von *BMP2*

Es wurden 50 CpGs erfasst. Methylierte CpGs sind durch schwarze Punkte, unmethylierte CpGs durch weiße Punkte dargestellt, an der rechten Seite ist die jeweilige mittlere Methylierungsrate aufgetragen. (a) genomische DNA und SSSI-behandelte DNA als Negativ- und Positivkontrolle für Methylierung. (b) DNA der RD-Zelllinie mit und ohne (solvent) Aza-Behandlung. (c) DNA der RH30-Zelllinie mit und ohne Aza-Behandlung. (d) DNA der RMS13-Zelllinie mit und ohne Aza-Behandlung.

5.4.2 Methylierungsanalyse mittels methylspezifischer PCR

Um diese Ergebnisse der Bisulfitsequenzierung zu bestätigen, wurde mit Hilfe der methylspezifischen PCR (siehe 4.1.3) der Methylierungsstatus über eine schnelle und effiziente Methode erneut evaluiert. Hierfür wurden zum einen ein Primerpaar aus der Arbeit von Wen et al. [97] verwendet und zum anderen zwei weitere Regionen (MSP Nr.1 und MSP Nr.2) ausgewählt, wobei die Region Nr.2, ebenso wie die Region Wen et al., noch in dem Sequenzabschnitt der Bisulfitsequenzierung und Region Nr.1 in eine CpG-reiche Region kurz vor dem Sequenzierungsbeginn gelegt wurde (Abbildung 7).

Als Positivkontrolle für Methylierung wurde erneut Sssl-behandelte DNA und als Negativkontrolle genomische DNA verwendet. Diese zeigten für alle drei der untersuchten Regionen wie erwartet einerseits eine starke Bande bei den Primern, die spezifisch für Methylierung sind, andererseits bei den Primern, die spezifisch für unmethylierte Cytosine sind. Für alle drei Zelllinien bestätigte die MSP-Analyse weitestgehend die Ergebnisse der Bisulfitsequenzierung. So zeigte sich für RD im unbehandelten Zustand (solvent) für alle drei Regionen eine starke unmethylierte Bande und nur für die Region Wen erschien zusätzlich eine Bande spezifisch für Methylierung. Nach Behandlung mit Aza kam es zu keiner wesentlichen Änderung der Banden von RD für alle drei Regionen. Die mit der Sequenzierung am stärksten korrelierenden Ergebnisse ergaben sich für RH30. Die Zelllinie zeigte für alle drei Regionen im solvent-Zustand ausschließlich stark methylierte Banden und konnte nach Behandlung mit Aza zum Teil demethyliert werden und folglich auch unmethylierte Banden aufweisen. Für die Zelllinie RMS13 ergaben sich ähnliche Ergebnisse, d.h. im solvent-Zustand stark methylierte Banden und nach Aza-Behandlung ein Erscheinen der unmethylierten Banden, was allerdings einen Unterschied zur Bisulfitsequenzierung darstellte, da hier die Demethylierung nur marginal zum Vorschein kam (Abbildung 9).

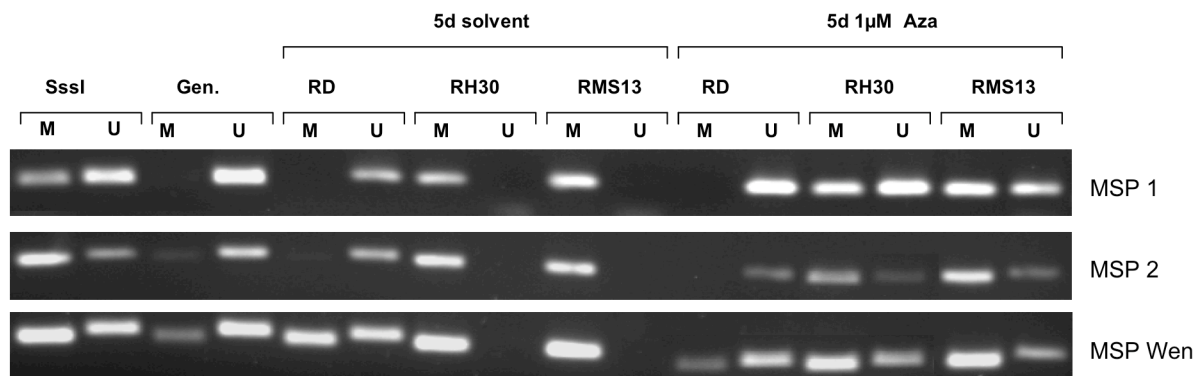


Abbildung 9: Methylspezifische PCR der Zelllinien RD, RH30 und RMS13 mit und ohne Behandlung mit 5-Aza-2'-deoxycytidin

Dargestellt sind hier die Agarosegelelektrophoresen von den Produkten der methylierungsspezifischen PCR. Als Positivkontrolle für Methylierung wurde Sssl-behandelte DNA (Sssl) und als Negativkontrolle genomische DNA (Gen.) verwendet. Die Zelllinien wurden zum einen im solvent-Zustand (solvent: 1 µl 50% Essigsäure) und zum anderen nach 5-tägiger Aza-Behandlung (Aza) untersucht. Die drei Regionen MSP 1, MSP 2 und MSP Wen wurden jeweils mit Primern spezifisch für Methylierung (M) und für keine Methylierung (U) mittels PCR untersucht.

Einen zusammenfassenden Überblick über die Ergebnisse der Bisulfitsequenzierung und der methylierungsspezifischen PCR gibt Abbildung 10.

		MSP 1	MSP 2	MSP Wen			BS
RD solvent		U	U	M+U			20% M
RD Aza		U	U	M+U			25% M
RH-30 solvent		M	M	M			98% M
RH-30 Aza		M+U	M+U	M+U			57% M
RMS-13 solvent		M	M	M			98% M
RMS-13 Aza		M+U	M+U	M+U			91% M

Abbildung 10: Zusammenfassung der Ergebnisse von Bisulfitsequenzierung und methylspezifischer PCR

U = unmethyliert, M = methyliert, BS = Bisulfitsequenzierung, MSP 1, 2, Wen = MSP Regionen, Aza = DNA nach 5-tägiger Aza-Behandlung, solvent = DNA nach 5-tägiger Behandlung mit Lösungsmittel

5.4.3 Analyse der Transkriptionsfaktor-Bindestellen im *BMP2*-CpG-Island

Da bekannt ist, dass die Bindung von Transkriptionsfaktoren im Promotorbereich von Genen sequenzspezifisch ist, durch eine entsprechende Methylierung dieser Bereiche verändert bzw. erschwert werden kann und sogar mit der Regulierung der DNA-Methylierung vergesellschaftet ist [103], wurden diese Bindestellen in unserem untersuchten Sequenzabschnitt näher analysiert. Es konnten 12 verschiedene Bindestellen von 9 Transkriptionsfaktoren gefunden werden, die jeweils mindestens ein CpG-Dinukleotid in ihrer Sequenz aufwiesen (TFSearch Vers. 1.3, Parallel Application TRC Laboratory, RWCP, Japan, Threshold 85.0 points). Für die Zelllinien RH30 und RMS13 zeigte sich, dass nahezu jedes dieser CpG-Dinukleotide im solvent-Zustand methyliert ist. Da RH30 nach Aza-Behandlung wie unter 5.4.1 und 5.4.2 eine starke Demethylierung aufwies, war dies auch hier für alle Transkriptionsfaktorbindestellen der Fall, wohingegen für RMS13 das Gegenteil zutraf. Die meisten Bindestellen der Zelllinie RD zeigten im solvent-Zustand kaum eine Methylierung der analysierten Cytosine und diese wurden auch durch Aza-Behandlung nicht wesentlich verändert. Nur die Bindestelle des Transkriptionsfaktors GATA-1 war im solvent-Zustand in knapp der Hälfte der Fälle methyliert und konnte durch die Behandlung mit Aza komplett demethyliert werden (Abbildung 11).

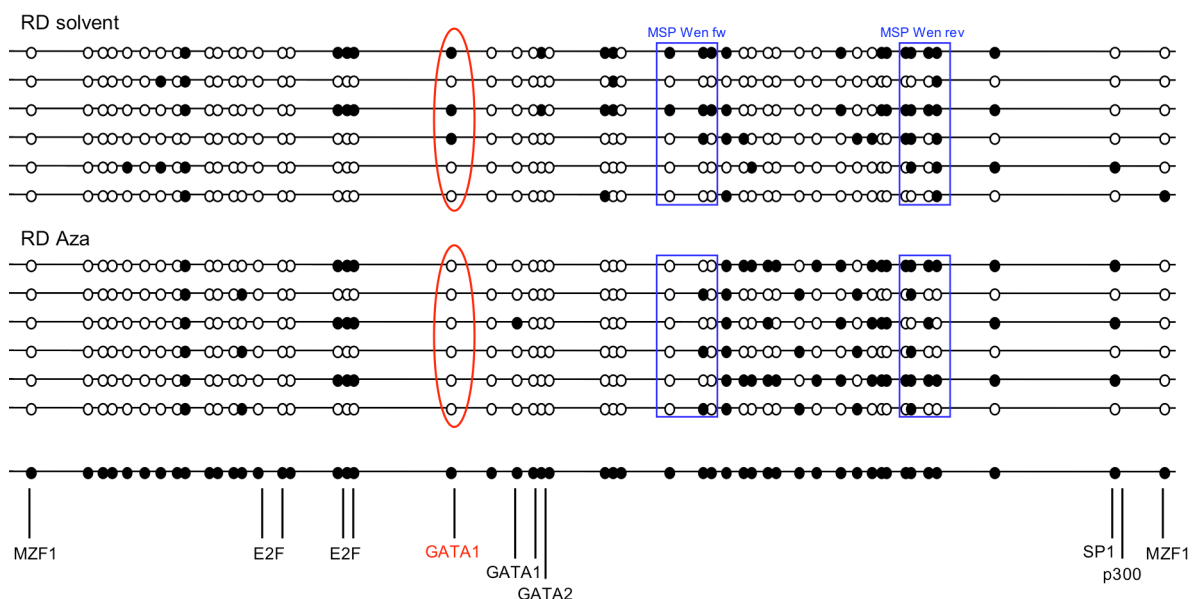


Abbildung 11: Bisulfite-Sequenzierung der Zelllinie RD mit und ohne Aza-Behandlung, Darstellung der Transkriptionsfaktorbindestellen

Dargestellt sind hier die Ergebnisse der Bisulfite-Sequenzierung der Zelllinie RD nach Behandlung einerseits mit Lösungsmittel, andererseits mit Aza. Blau markiert ist der Bereich der von der MSP Wen et al. abgedeckt wird, rot markiert ist das CpG-Dinukleotid, welches in der Bindestelle des Transkriptionsfaktors GATA-1 liegt. Anhand der untersten Linie mit Punkten werden die Lokalisationen der Bindestellen unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren angezeigt. Weiße Kreise = unmethyliertes CpG, schwarze Kreise = methyliertes CpG.

5.5 Reaktivierung von BMP2

5.5.1 Herstellung eines BMP2 - Expressionsplasmides

Um eine Reaktivierung von *BMP2* in den Rhabdomyosarkomzelllinien zu erreichen wurde zunächst eine transiente Transfektion durchgeführt. Für diese Transfektion wurde zuerst ein geeignetes Expressionsplasmid kloniert. Hierfür wurde die kodierende Sequenz für BMP2 zunächst aus dem Vektor pGEM-TEasy+BMP2 (Prof. Dr. F. Beuschlein, LMU München), ausgeschnitten und in pIRES-EGFP kloniert (siehe 4.3.6.2). Danach wurde ein Verdau mit *Sma*I durchgeführt, um festzustellen, ob die Sequenz die richtige Orientierung, d.h. 5'-3', nach der Ligation in pIRES-EGFP aufwies (siehe 4.3.10.2). Die anschließende Sequenzkontrolle mittels direkter Sequenzierung (Eurofins MWG Operon, Ebersberg) ergab zwei Mutationen in der *BMP2*-Sequenz, wobei eine der beiden die Aminosäuresequenz nicht veränderte. Diejenige, die zu einem Aminosäureaustausch bei Transkription führt, wurde mit dem QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit beseitigt und die Originalsequenz damit wiederhergestellt (siehe 4.3.10.2). Diese nun korrekte Sequenz wurde zusätzlich noch in den Vektor pcDNA3.1 kloniert. Am Ende standen die beiden Expressionsplasmide pIRES-EGFP+BMP2 und pcDNA3.1+BMP2 für die geplanten Transfektionsversuche zur Verfügung.

5.5.2 Etablierung einer geeigneten Transfektionsmethode für RMS

Da für RMS-Zelllinien in unserem Labor noch keine Standardmethode zur Transfektion vorhanden war, musste zuerst die richtige Methode etabliert werden. Anfangs standen zwei Varianten zur Verfügung, zum einen die Transfektion mit Hilfe der Elektroporation und zum anderen die Transfektion mit Hilfe der Lipofektion (siehe 4.2.5). Um die richtige Methode zu finden wurden die Eigenschaften des Plasmids pEGFP ausgenutzt. Dieses Plasmid kodiert für das grün-fluoreszierende Protein GFP. Nach erfolgreicher Transfektion kann daher unter dem Fluoreszenzmikroskop eine Grünfärbung der Zellen beobachtet werden. Beide Methoden wurden mit dem Leerplasmid pEGFP durchgeführt und danach anhand der Färbung unter dem Fluoreszenzmikroskop die Transfektionsrate bestimmt.

Für die Elektroporation (siehe 4.2.5.1) zeigten sich stark differierende Werte. Auf der einen Seite ergaben sich für die Zelllinien RD und RMS13 für alle drei Zeitpunkte (24h, 48h und 72h) und beide Spannungen (250V und 350V) nur eine minimale Anzahl grün-positiver Zellen, die zwischen ca. 1- 4% lag. Auf der anderen Seite konnten für RH30 bei 250V ca. 10 - 20% und bei 350V bis zu ca. 30 - 40% der Zellen erfolgreich transfiziert werden.

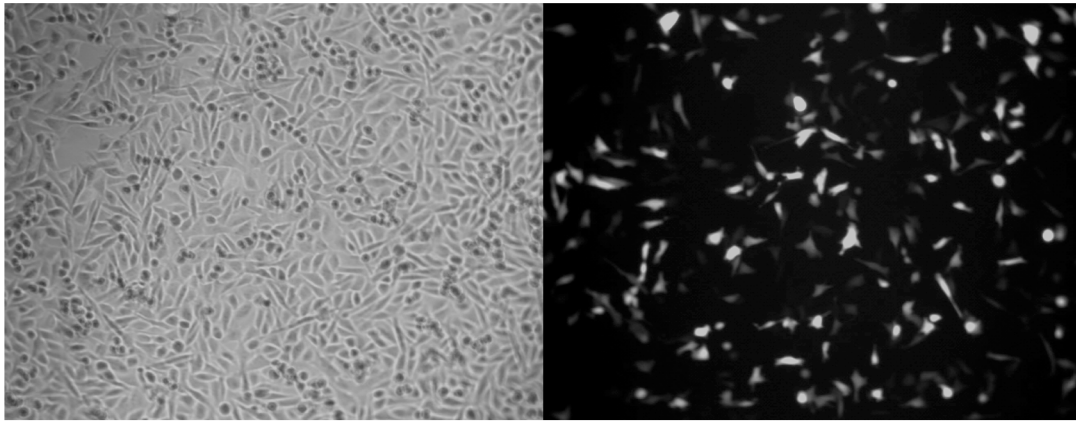
Die Ergebnisse der Lipofektion (siehe 4.2.5.2) gestalteten sich dagegen wesentlich homogener. Bei 24h ergab sich für alle drei Zelllinien ein Anteil grün-positiver Zellen von ca.

10% (Abbildung 12 a). Dieser Anteil konnte nach einer Behandlungszeit von 48h auf ca. 20% sowohl bei RD und RMS13, als auch bei RH30 gesteigert werden.

Da der Transfektionserfolg der Lipofektion im Gegensatz zur Elektroporation für alle drei Zelllinien gleich gut bei 20% nach 48h Behandlung ausfiel, wurde die Lipofektion für alle weiteren Versuche verwendet.

Nach Lipofektion der Zellen mit pIRES-EGFP und pIRES-EGFP+BMP2 wurde RNA gewonnen und nun die Reaktivierung von *BMP2* und somit auch die Transfektionsrate ein weiteres Mal genauer evaluiert (Abbildung 12 b).

(a)



(b)

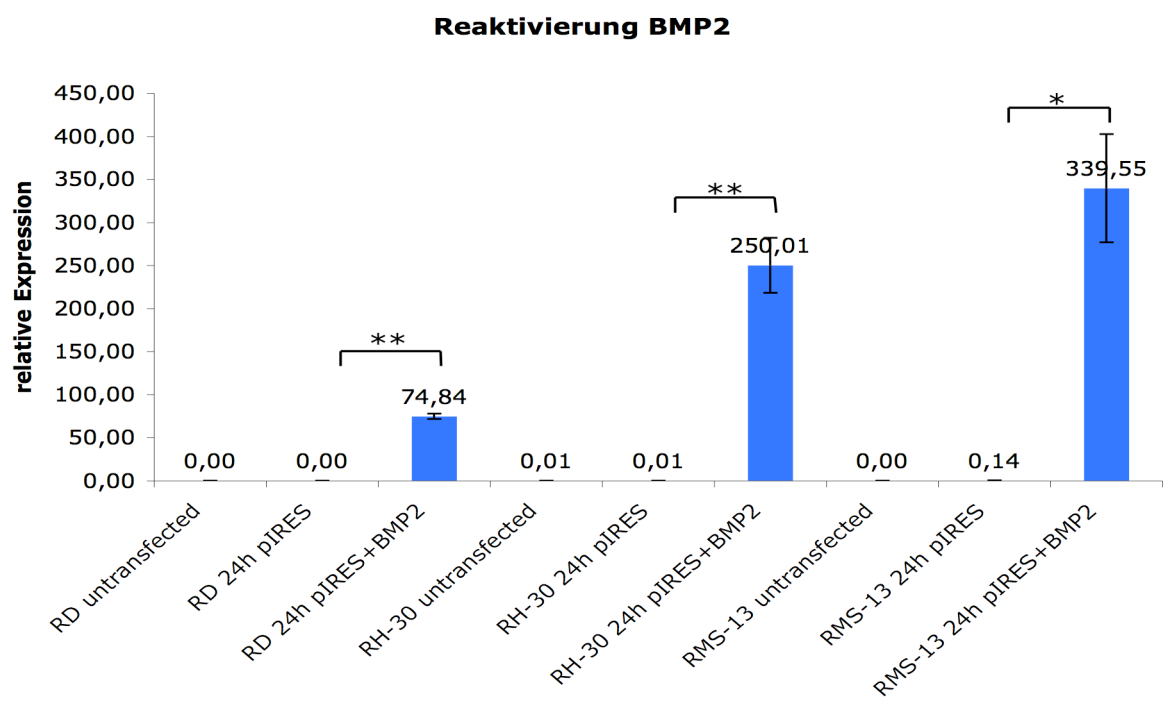


Abbildung 12: Transfektionserfolg und Reaktivierung von *BMP2* nach Transfektion mittels Lipofektion

(a) Darstellung der erfolgreich mit pEGFP transfizierten RH30-Zellen. Das linke Bild zeigt die Gesamtzellpopulation, das rechte Bild nur die erfolgreich transfizierten und damit grün fluoreszierenden Zellen. Es ergibt sich hiermit der Transfektionserfolg von ca. 10% bei 24h mittels Lipofektion.

(b) Dargestellt ist die zu dem Haushaltsgen *TATA-Box-Binding Protein (TBP)* relative Expression von *BMP2*, zum einen im untransfizierten Zustand (untransfected) und zum anderen nach Transfektion mit dem Leerplasmid pIRES-EGFP (pIRES) oder dem Expressionsplasmid pIRES-EGFP+BMP2 (pIRES+BMP2) nach 24h und 48h Behandlung. *: t-Test < 0,05; **: t-Test < 0,01.

Die relative Expression von *BMP2* geht sowohl im unbehandelten, untransfizierten Zustand, als auch nach Transfektion mit dem Leerplasmid pIRES-EGFP ohne BMP2-Insert nahezu gegen null. Nach Transfektion mit dem Plasmid pIRES-EGFP+BMP2, welches die vollständige *BMP2*-cDNA-Sequenz enthält, steigt die Expression eklatant an, erreicht Werte zwischen 75 und 340 relativ zu TBP und verzeichnet daher einen hoch signifikanten Anstieg. Es konnte folglich für die Transfektion der RMS-Zelllinien die Lipofektion etabliert werden und die relative Expression um das 10.000 - 400.000fache gesteigert werden.

5.5.3 Auswirkungen einer *BMP2* - Reaktivierung auf die Zellproliferation

Die Reaktivierung von *BMP2* in den RMS-Zelllinien wurde zum einen mittels transienter Transfektion (siehe 4.2.5) und andererseits durch die Behandlung mit rekombinantem humanem BMP2 (rhBMP2) (siehe 4.2.6) erreicht.

Die transiente Transfektion sollte hierbei, über die Einschleusung der für *BMP2*- kodierenden Sequenz in die Tumorzellen, zu einer verstärkten Eigenproduktion des Proteins BMP2 durch die Zellen selbst führen und damit den zugehörigen Signalweg aktivieren. Um einen alternativen Weg für die Reaktivierung von *BMP2* zu erhalten, wurde die Zugabe von rhBMP2 als zweite Reaktivierungsmethode ausgewählt. Indem schon das komplette funktionsfähige Protein von außen zugegeben wird, kann die Signalkaskade direkt über die Bindung von BMP2 an die entsprechenden Rezeptoren BMPR1A, BMPR1B und BMPR2 aktiviert und die darauf folgenden Reaktionen beobachtet werden.

Die Auswirkungen auf die Zellproliferation nach Reaktivierung von *BMP2* wurde durch den MTT-Proliferationsassay (siehe 4.2.7) evaluiert.

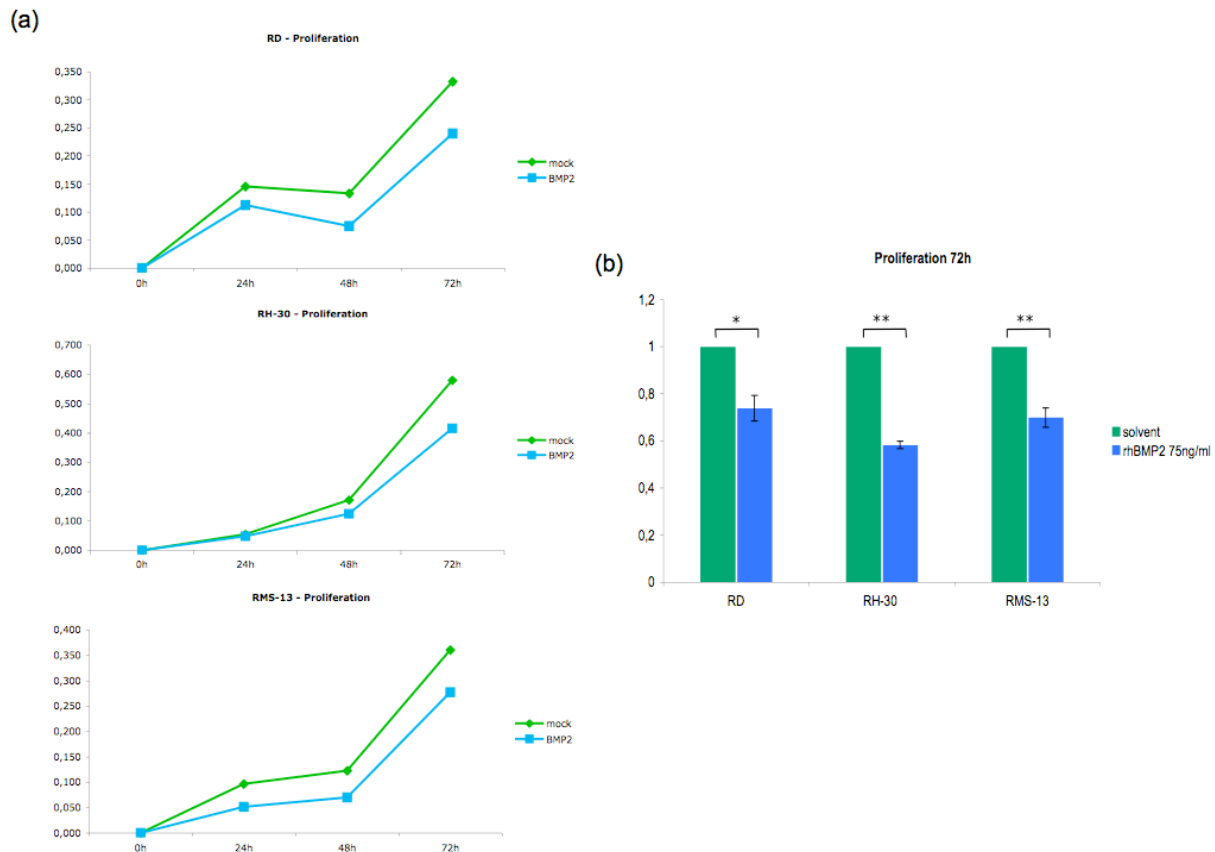


Abbildung 13: Proliferation der RMS-Zellen nach Reaktivierung von *BMP2*

(a) MTT-Proliferationsassay nach transienter *BMP2*-Transfektion pro Zelllinie über die Zeit aufgetragen (mock = Transfektion mit pIRES-EGFP bzw. pcDNA3.1, BMP2 = Transfektion mit pIRES-EGFP+BMP2 bzw. pcDNA3.1+BMP2). Auf 0h normiert. (b) MTT Proliferationsassay nach Behandlung der Zellen mit 75 ng/ml rhBMP2 zum Zeitpunkt 72h, auf 1 normiert. *: t-Test < 0,05; **: t-Test < 0,01.

Nach transienter Transfektion zeigte sich für alle drei Zelllinien im MTT-Assay eine Abnahme der Proliferation der mit *BMP2*-Plasmid gegenüber den mit Leerplasmid transfizierten Zellen über die Zeit. Der größte Proliferationsunterschied konnte sowohl für die RD-Zellen, als auch die RH30- und RMS13-Zellen bei dem Zeitpunkt von 72h nachgewiesen werden (Abbildung 13 a).

Die Behandlung mit rhBMP2 resultierte ebenfalls in einer starken Proliferationsabnahme der RMS-Zellen. Bei der Behandlung mit rhBMP2 wurden verschiedene Konzentrationen ausgewertet. Die Konzentrationen 100 und 200 ng/ml rhBMP2 (hier nicht dargestellt) resultierten in einem totalen Vitalitätsverlust zu jedem Zeitpunkt (24h, 48h, 72h). Im Gegensatz hierzu konnte bei einer Konzentration von 50 ng/ml (hier nicht dargestellt) kaum eine Proliferationsabnahme verzeichnet werden, das Wachstumsverhalten glich den unbehandelten Zellen. Zwischen diesen beiden Extremen lag das Proliferationsverhalten derjenigen Zellen, die mit 75 ng/ml rhBMP2 behandelt wurden. Bei einem

Behandlungszeitraum von 72h nahm bei allen drei Zelllinien, am stärksten allerdings bei RH30, die Proliferation signifikant ab (Abbildung 13 b).

5.5.4 Auswirkung einer *BMP2*-Reaktivierung auf das Apoptoseverhalten

Nach den Auswirkungen auf das Proliferationsverhalten der RMS-Zelllinien sollte nun auch deren Apoptoseverhalten näher betrachtet werden. Hierfür wurden die Zellen erneut mit rhBMP2 zu einer Konzentration von 75 ng/ml (basierend auf den Ergebnissen der Proliferationsversuche) über einen Zeitraum von 72h behandelt und alle 24h die Apoptoserate der Zellen mittels Annexin V-Calcein-Assay evaluiert (siehe 4.2.8).

Anhand des Verteilungsmusters der Zellen im Scatterplot konnte ein Bereich festgelegt werden, der diejenigen Zellen beinhaltet, die sowohl Calcein- als auch Annexin V- positiv sind und sich somit in der frühen Apoptose befinden. Es zeigte sich, dass der Anteil dieser Zellen für die Beobachtungszeitpunkte 24h und 48h mit und ohne 75 ng/ml rhBMP2 Behandlung für alle drei Zelllinien zwischen 1% und 3% lag (hier nicht dargestellt).

Für eine Behandlungsdauer von 72h unterschied sich die Apoptoserate der Zelllinien RD und RMS13 nur marginal zwischen den mit Lösungsmittel und den mit 75 ng/ml rhBMP2 behandelten Zellen. Bei RD stieg sie von 5,2 % auf 5,7% und bei RMS13 von 2,4% auf 2,8% an. Nach einer Behandlungsdauer von 72h zeigte sich jedoch bei RH30 ein Anstieg von 4,8% im unbehandelten auf 16,7% im behandelten Zustand (Abbildung 14).

Neben diesen auf die Apoptose bezogenen Ergebnissen zeigte sich zu diesem Behandlungszeitpunkt sowohl bei RD als auch bei RH30 und RMS13 eine starke Verringerung des Anteils vitaler Zellen (Calcein-positiv) an allen Zellen, die mit rhBMP2 behandelt wurden (Abbildung 14).

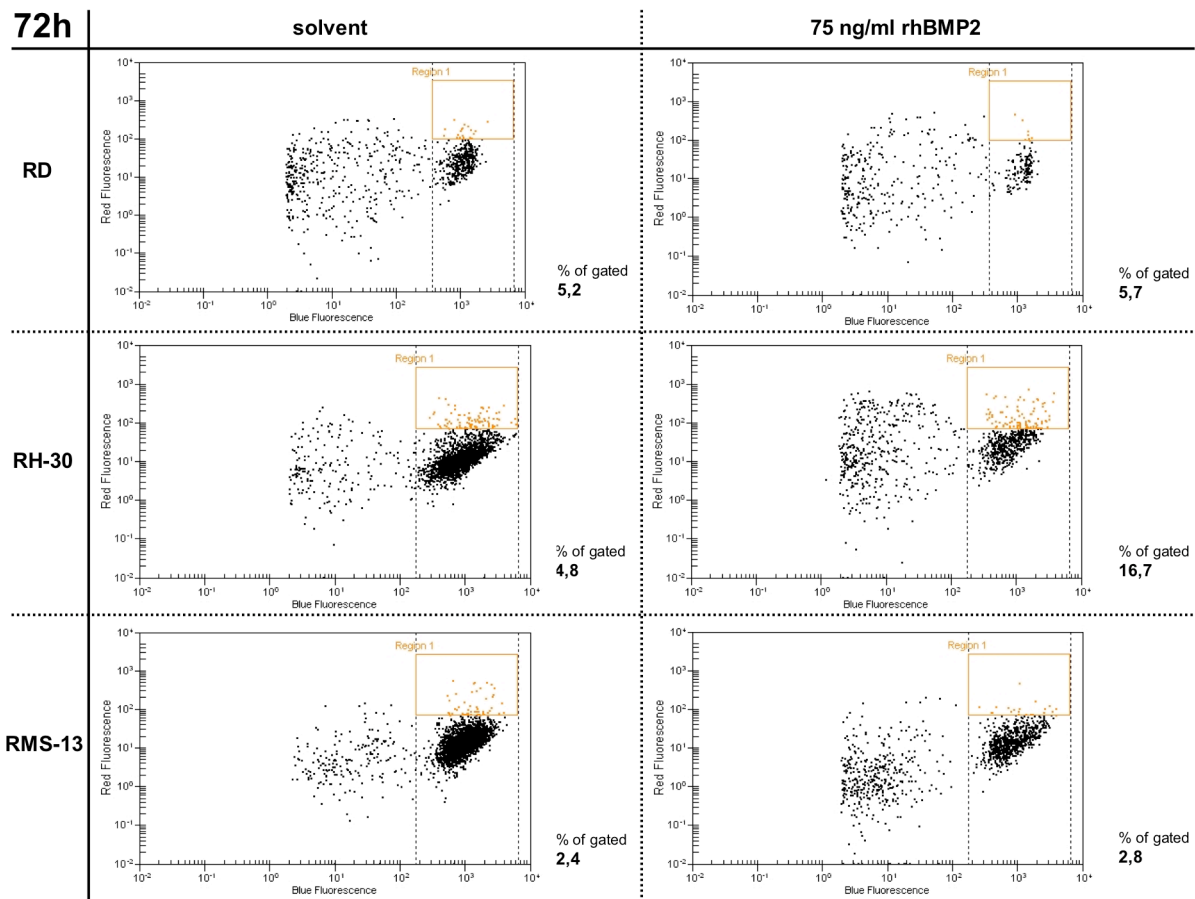


Abbildung 14: Apoptoseverhalten der RMS-Zelllinien nach rhBMP2-Behandlung

Dargestellt ist hier der Annexin V-Calcein-Assay für die Zelllinien RD, RH30 und RMS13 einerseits im solvent-Zustand (mit Lösungsmittel behandelt) und andererseits nach Behandlung mit 75 ng/ml rhBMP2, die Behandlungsdauer ist 72h. Jeder Datenpunkt steht für eine einzelne Zelle. Je höher die blaue Fluoreszenz ist, desto stärker ist auch die Calcein-Färbung und damit die Vitalität der Zellen. Je höher die rote Fluoreszenz ist, desto stärker ist die Färbung gegen Annexin V. Sind Zellen sowohl Calcein- als auch Annexin V- positiv gefärbt, befinden sie sich in der frühen Apoptose. Diese Zellen sind in der Grafik in Region 1 eingegrenzt. Die Zahl % of gated spiegelt den Anteil der Zellen wider, die sich in der Region 1 befinden im Verhältnis zur Gesamtzellzahl.

Eine Quantifizierung des Anteils an vitalen Zellen im Annexin V-Calcein-Assay zum Zeitpunkt 72h zeigte eine starke Abnahme der vitalen Zellen, wobei dieser Effekt bei RH30 und RMS13 am stärksten war. Diese Abnahme des Anteils an vitalen Zellen unter Behandlung mit 75 ng/ml rhBMP2 im Vergleich zu solvent-Bedingungen erreichte bei 72h signifikante Werte bei den Zelllinien RD und RMS13 (Abbildung 15).

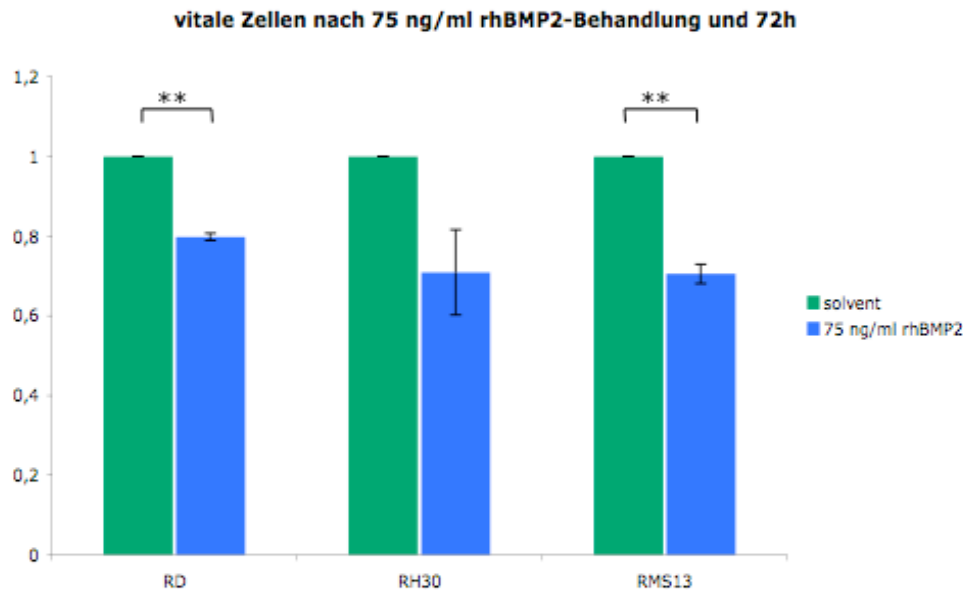


Abbildung 15: Anteil vitaler Zellen nach Behandlung mit rhBMP2

Dargestellt ist der Anteil der Calcein-positiven und damit vitalen Zellen an allen Zellen nach Behandlung mit 75 ng/ml rhBMP2 für 72h. Hierbei wurde der solvent-Wert (nur mit Lösungsmittel behandelt) auf 1 gesetzt und die anderen Werte darauf normiert. *: t-Test < 0,05; **: t-Test < 0,01.

5.5.5 Auswirkung einer BMP2-Reaktivierung auf die Zielgenexpression

Es ist bekannt, dass durch die Bindung von BMP2 an seine Rezeptoren eine Signalkaskade ausgelöst wird, die eine transkriptionelle Aktivierung von Zielgenen wie *inhibitor of DNA binding 1* und 2 (*ID1*, *ID2*) zur Folge hat [76]. Auf diesem Sachverhalt gründend sollte nun überprüft werden, ob nach Substitution von rhBMP2 der entsprechende Signalweg tatsächlich aktiviert werden kann und somit die Zielgene *ID1* und *ID3* verstärkt exprimiert werden. Nach Behandlung der Zelllinien über 72h mit 75 ng/ml rhBMP2 wurde RNA gewonnen und die Expression von *ID1* + 3 mittels Q-PCR zum einen in nur mit Lösungsmittel (solvent) und zum anderen mit rhBMP2 behandelten Zellen bestimmt. Für *ID1* zeigte sich bei RH30 ein signifikanter und bei RD ein moderater Anstieg der Expression nach rhBMP2-Behandlung, wohingegen bei RMS13 kein Anstieg verzeichnet werden konnte. Im Gegensatz dazu konnte *ID3* sowohl in RH30 als auch in RMS13 stark signifikant reaktiviert werden. RD zeigte hier keine Zunahme der Expression (Abbildung 16).

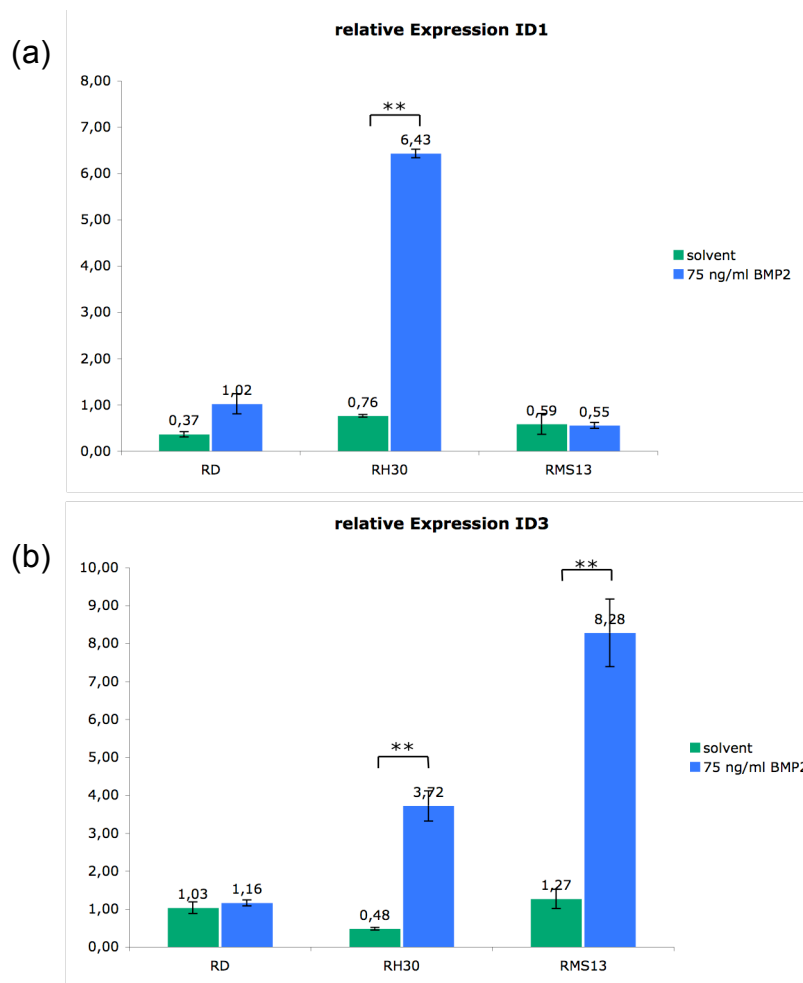


Abbildung 16: Relative Expression der Zielgene *ID1* und *ID3* nach Behandlung der Zelllinien zum einen mit Lösungsmittel (solvent) und zum anderen mit rhBMP2.

Dargestellt ist die zu dem Haushaltsgen *TATA-Box-Binding Protein (TBP)* relative Expression von *ID1* und *ID3* einerseits im solvent - Zustand und andererseits nach 72h Behandlung mit 75 ng/ml rhBMP2. *: t-Test < 0,05; **: t-Test < 0,01.

Da der Wachstumsfaktor *IGF2* in RMS oft überexprimiert ist und das Tumorstadium mitbegünstigen kann [28, 104], wollten wir nun die potentielle Auswirkung einer rhBMP2-Behandlung auf die Expression dieses Gens in unseren Zelllinien analysieren. Neben *IGF2* wurde noch *IGFBP3*, kodierend für ein Bindeprotein, welches die Halbwertszeit und Wirkungen von IGF2 beeinflussen kann, und *IGF1R*, kodierend für den IGF2-Rezeptor, untersucht [105]. Es zeigte sich eine sehr hohe *IGF2*-Expression bei allen drei Zelllinien, wobei die embryonale Zelllinie RD die höchsten Werte aufwies. Die Expression von *IGFBP3* dagegen war bei RH30 und RMS13 nahezu nicht vorhanden, bei RD erreichte sie nur sehr geringe Werte im Vergleich zu denjenigen, die bei Analyse von *IGF2* auftraten. *IGF1R* ist wiederum in allen drei Zelllinien nahezu gleich hoch exprimiert.

Durch die Behandlung mit rhBMP2 konnte für jedes der drei Gene in allen Zelllinien keine signifikanten Änderungen der Expression erreicht werden (Abbildung 17).

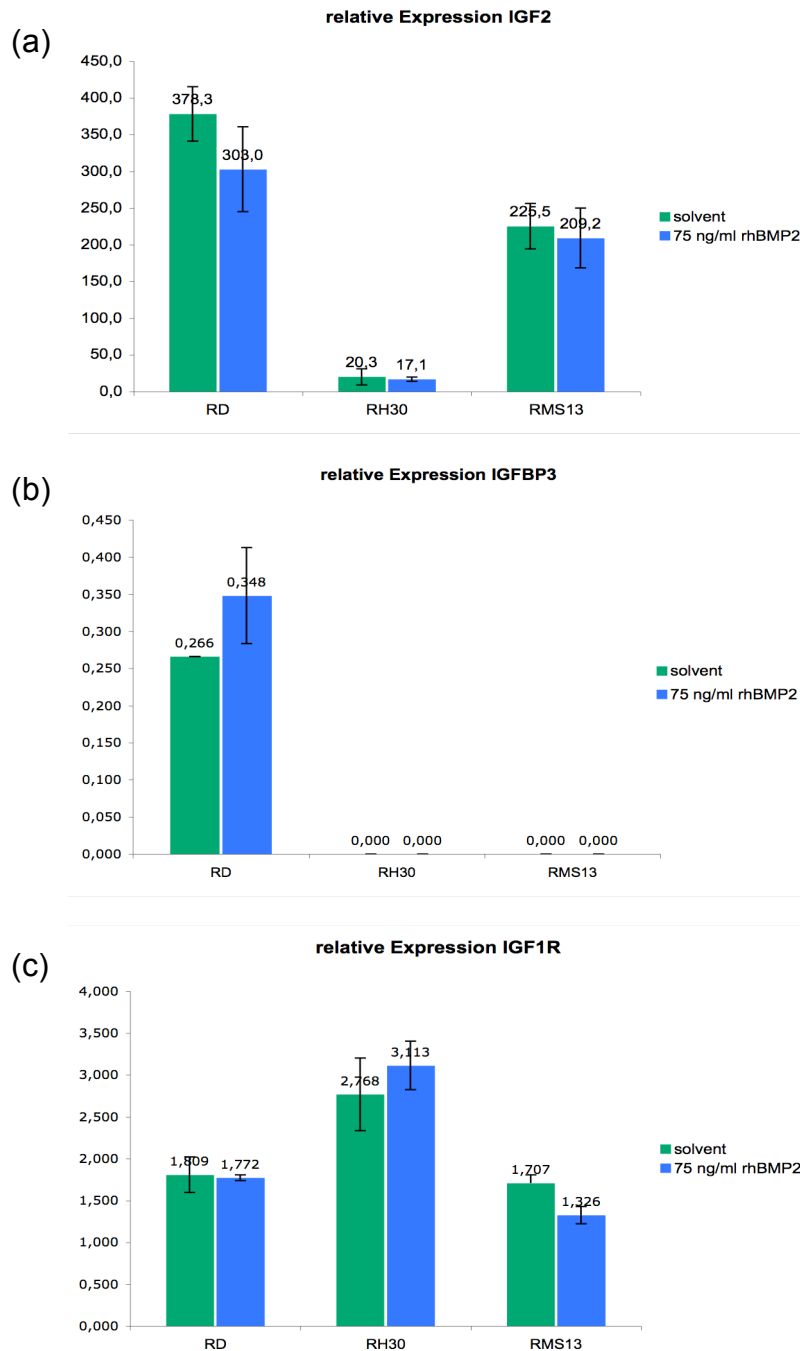


Abbildung 17: Relative Expression der Gene *IGF2*, *IGFBP3* und *IGF1R* nach Behandlung der Zelllinien zum einen mit Lösungsmittel (solvent) und zum anderen mit rhBMP2.

Dargestellt ist die zu dem Haushaltsgen *TATA-Box-Binding Protein (TBP)* relative Expression von *IGF2* (a), *IGFBP3* (b) und *IGF1R* (c) einerseits im solvent-Zustand und andererseits nach 72h Behandlung mit 75 ng/ml rhBMP2.

Um die Wirkweise von *BMP2*, vor allem die antiproliferative Komponente, näher zu studieren, wurden weitere potentielle Zielgene und deren Expression bestimmt. Hierfür wurden die Wachstumsinhibitoren *CDKN1A* (*p21*), der wie bekannt ist, auch in Magenkarzinomen [106] und glatten Muskelzellen [107] über rhBMP2 aktiviert werden kann und folglich zu einer verminderten Zellproliferation führt, sowie *CDKN2A* (*p16*) und *CDKN2B* (*p15*) näher untersucht. Die Expression dieser Gene wurde ebenso wie oben beschrieben mittels Q-PCR bestimmt. Bei den alveolären Zelllinien RH30 und RMS13 zeigte sich für alle drei untersuchten Gene keine signifikante Zunahme der Expression nach Behandlung mit rhBMP2. Die embryonale Zelllinie RD hingegen wies für jedes der drei Gene eine signifikante Steigerung der relativen Expression nach rhBMP2-Behandlung auf (Abbildung 18).

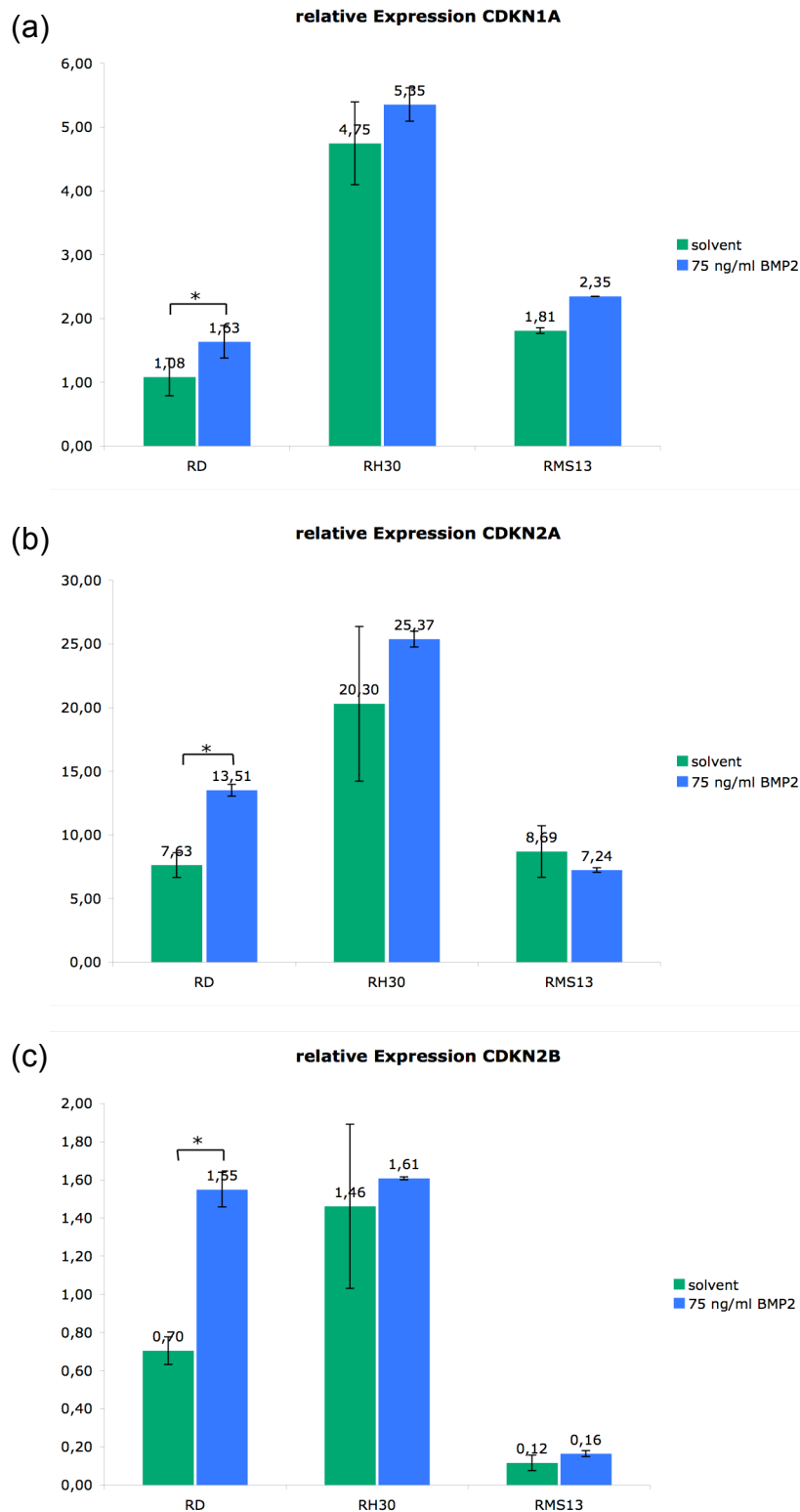


Abbildung 18: Relative Expression der Wachstumsinhibitoren *CDKN1A*, *CDKN2A* und *CDKN2B* nach Behandlung der Zelllinien zum einen mit Lösungsmittel (solvent) und zum anderen mit rhBMP2.

Dargestellt ist die zu dem Haushaltsgen *TATA-Box-Binding Protein (TBP)* relative Expression von *CDKN1A* (a), *CDKN2A* (b) und *CDKN2B* (c) einerseits im solvent-Zustand und andererseits nach 72h Behandlung mit 75 ng/ml rhBMP2. *: t-Test < 0,05; **: t-Test < 0,01.

6 Diskussion

Menschliche Tumoren entstehen durch die progressive Akkumulation von genetischen Alterationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen [108, 109]. Neben diesen genetischen Veränderungen können nach heutigem Wissenstand auch epigenetische Veränderungen zu einem Funktionsverlust dieser Gene beitragen. Die Stilllegung von Tumorsuppressorgenen durch Promotor-Hypermethylierung stellt hierbei ein Schlüsselereignis dar, welches ein unkontrolliertes Zellwachstum ermöglicht [3]. Es konnten in den letzten Jahren eine ganze Reihe solcher, durch Hypermethylierung ausgeschalteter Gene, die wichtig in der Kontrolle des Zellwachstums sind, identifiziert werden. Unter diesen befinden sich einige Gene, die schon öfter mit der Tumorentstehung in Verbindung gebracht wurden, wie beispielsweise der Zellzyklusinhibitor *p16* in einer ganzen Reihe an Tumorentitäten [110], das DNA-Reparatur Gen *BRCA1* in malignen Tumoren der Brust und des Ovars [111, 112], oder das DNA-Mismatch-Reparatur Gen *MLH1* in Tumoren des Gastrointestinaltrakts [113, 114]. Wie man anhand dieser Beispiele sehen kann, greifen epigenetische Veränderungen in eine ganze Reihe von Vorgängen ein, die für das physiologische Zellwachstum verantwortlich sind, und begünstigen hiermit das Tumorstadium.

6.1 Expressions- und Methylierungsanalyse in RMS-Zelllinien

Über den Methylierungsstatus von RMS ist aktuell relativ wenig bekannt. Das bisherige Wissen beschränkt sich auf die Hypermethylierung des Promotors von *PAX3* [115], vor allem in embryonalen RMS-Formen, von *p21^{WAF1}* [116] und von *RASSF1A* [4]. Es wurde gezeigt, dass *RASSF1A* in Lungenkarzinomen als Tumorsuppressor agiert [117, 118] und ebenso in vielen anderen Tumoren, welche Brust, Niere, Blase und Ovar betreffen [119-121], inaktiviert ist. *RASSF1A* scheint also auch in RMS in der Tumorgenese von Bedeutung zu sein und über ein aberrantes Methylierungsmuster reguliert zu werden. Dies deutet darauf hin, dass sich epigenetische Alterationen nicht nur auf adulte Tumoren, bei welchen dieses Phänomen schon oft nachgewiesen und unter anderem durch den Alterungsprozess und den damit vergesellschafteten Veränderungen der DNA-Methylierung begründet wurde [122], beschränken, sondern auch in Tumoren der Kindheit, wie dem RMS, auftreten können. Durch die Tatsache, dass den epigenetischen Veränderungen immer mehr an Bedeutung in der Tumorentstehung, auch bei pädiatrischen Formen, zugesagt wird und diese im RMS noch kaum erforscht wurden, können neue Erkenntnisse zu veränderten Methylierungsmustern zum Verstehen der RMS-Genese und damit zu einer möglicherweise verbesserten Therapie beitragen.

Der erste Schritt zur Methylierungsanalyse im RMS war die Behandlung drei verschiedener RMS-Zelllinien mit dem Agens 5-Aza-2'-deoxycytidin (Aza). Aza führt zu einer Inhibition der „maintenance“-Methyltransferase DNMT1 und damit zu einer verminderten Methylierung des DNA-Tochterstranges nach Replikation [123]. Es standen die Zelllinien RD, als Vertreter des embryonalen RMS, sowie RH30 und RMS13, als Vertreter des alveolären RMS, zur Verfügung. Es wurde eine Reihe an Genen überprüft (Abbildung 4), die in embryonalen Signalwegen eine Rolle spielen und durch eine Fehlregulation zur Tumorenstehung beitragen könnten. So wurden diverse Gene des Hedgehog-, BMP/SMAD-, WNT- und MAPK/ERK-Signalweges, von welchen teilweise in anderen Tumoren eine Hypermethylierung bekannt ist (*PTCH1* [124], *HHIP* [125], *BMP2* [97], *SPRY2* [126], etc.), aber auch andere Gene, die wichtig in der Kontrolle von Zellwachstum und Differenzierung (*CDKN1A,B,C*, *CDKN2A,B*, *BAX*, *BCL2* etc.) sind, untersucht und deren Expressionsanstieg nach Demethylierung analysiert. Die deutlichsten Reaktivierungen zeigten sich zum einen bei *RASSF1A*, was bereits von Harada et al. [4] für RMS beschrieben wurde, und als neue Erkenntnis bei *BMP2*. Eine Quantifizierung des Expressionsanstiegs nach Behandlung mit Aza zeigte für jede der drei Zelllinien Werte um das 50. – 100. -fache.

Es ist bekannt, dass *BMP2* ein negativer Regulator des Muskelwachstums ist und mit fortschreitender embryonaler Entwicklung des Skelettmuskels bei Ratten ein erhöhtes Proteinlevel aufweist, welches negativ mit der Muskel-Protein-Synthese korreliert [127-129]. Wird *Follistatin*, ein positiver Regulator des Muskelwachstums, der unter anderem auch *BMP2* antagonisieren kann, in Mäusen überexprimiert, führt das zu einer dramatischen Zunahme der Skelettmuskelmasse [130, 131]. Dies weist darauf hin, dass eine adäquate *BMP2*-Expression in der normalen Skelettmuskelzelle wichtig ist, da dieses Gen eine regulatorische Aufgabe zu haben scheint und nach einem Expressionsverlust von *BMP2* in Tumorzellen das aberrante Muskelwachstum mitbegünstigt werden könnte. Interessanterweise führte die Aza-Behandlung der RMS-Zelllinien zu einem Expressionsanstieg von *BMP2* auf das Niveau der Expression in gesundem Muskelgewebe (Abbildung 5). Dieser Expressionsunterschied von *BMP2* in gesundem Muskel zu den unbehandelten Zelllinien konnte auch in der Gelelektrophorese bestätigt werden (Abbildung 6).

Weiterhin ist bekannt, dass *BMP2* in Magenkarzinomen epigenetisch reguliert ist [97] und in einer Reihe an malignen Tumoren, wie auch in den pädiatrischen Medulloblastomen [93], nach Behandlung mit rekombinantem BMP2 eine Proliferationshemmung der Tumorzellen zu beobachten ist. Neben einer gestörten *BMP2*-Expression in manchen Tumoren ist in anderen malignen Erkrankungen, wie der FAP und dem sporadischen Colonkarzinom, ein defekter BMP2/Smad-Signalweg bekannt und in die Tumorgenese involviert [94, 95]. Um zu zeigen, dass der BMP2/Smad-Signalweg in RMS intakt ist und eine Rekonstitution von

BMP2 seine Wirkung entfalten könnte, wurden die entsprechenden Rezeptoren näher untersucht. Jeder der drei Rezeptorkomponenten, *BMPR1A*, *BMPR1B* und *BMPR2*, konnte sowohl in gesundem Muskelgewebe, als auch in allen drei RMS-Zelllinien nachgewiesen werden (Abbildung 6). Dies deutet darauf hin, dass in RMS nur die *BMP2*-Expression gestört ist, der eigentliche Signalweg aber intakt ist.

Da Aza zu einer Inhibierung der DNMT1 und somit zu einer verminderten Methylierung der Tumorzellen führt [132], beruht der vorhin genannte Expressionsanstieg von *BMP2* nach Aza-Behandlung mit hoher Wahrscheinlichkeit auf einer Änderung des Methylierungsmusters vom Status der Hypermethylierung zu einem geringer methylierten Zustand.

Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde das Methylierungsmuster von *BMP2* untersucht. Hierfür wurde eine Bisulfitsequenzierung in dem Promotorbereich von *BMP2* durchgeführt. Für die embryonale Zelllinie RD zeigte sich nur eine geringe Methylierung sowohl vor, als auch nach der Behandlung mit Aza. Bei den beiden alveolären Zelllinien RH30 und RMS13 konnte eine nahezu 100%ige Methylierung nachgewiesen werden, eine deutliche Demethylierung nach Aza-Behandlung stellte sich allerdings nur bei RH30 ein (Abbildung 8). Diese Methylierungsmuster in den Tumorzellen stehen in klarem Gegensatz zu der *BMP2*-Promotor-Methylierung von genomischer DNA, die nahezu 100% unmethyliert ist.

Eine Bestätigung dieser Ergebnisse wurde mit der Durchführung der methylspezifischen PCR erreicht. Es wurden hierbei zwei Regionen im Bereich der Bisulfitsequenzierung (MSP2 und MSP Wen) und eine Region vor diesem Bereich (MSP1) analysiert, um einen noch größeren Abschnitt des *BMP2*-Promotors abzudecken (Abbildung 9). Die Daten der Bisulfitsequenzierung korrelieren sehr gut mit den Ergebnissen der methylierungsspezifischen PCR. Auf den ersten Blick sind allerdings zwei Ausnahmen zu nennen. Die Region MSP Wen zeigte in einer Arbeit von Wen et al. aus dem Jahre 2006, dass *BMP2* in Magenkarzinomen stark methyliert und über diesen Mechanismus herabreguliert ist [97]. Diese Region wies auch in unserer PCR starke Methylierungen für jede der drei Zelllinien auf. Man könnte annehmen, dass dies für die Zelllinie RD nicht mit der Sequenzierung, die insgesamt nur einen Methylierungsgrad von ca. 20% aufwies, übereinstimmt, allerdings zeigt sich, bei Betrachtung der MSP-Region Wen direkt in den Sequenzierungsergebnissen, dass auch hier dieser Bereich stark methyliert ist (Abbildung 11). Daher ist eine kräftige Bande in der methylspezifischen PCR auch nicht verwunderlich.

Der zweite vermeintliche Unterschied zeigt sich bei der Zelllinie RMS13. Nach Aza-Behandlung konnte in der Sequenzierung nur eine marginale Demethylierung erreicht werden. Diese Demethylierung zeigt sich dagegen in der methylierungsspezifischen PCR etwas ausgeprägter, dies aber hauptsächlich bei der MSP-Region 1. Da sich diese allerdings vor der sequenzierten DNA-Sequenz befindet, sind diese Ergebnisse unabhängig voneinander zu betrachten und deshalb nicht als Unterschied anzusehen.

Wie können nun diese Methylierungsanalysen in Einklang gebracht werden mit der beobachteten Reaktivierung der Expression von *BMP2* nach der Behandlung mit Aza?

Bei den alveolären Zelllinien RH30 und RMS13 kann davon ausgegangen werden, dass durch die starke Promotor-Hypermethylierung eine Stilllegung von *BMP2* zustande kommt. Dieser epigenetische Mechanismus, wie oben beschrieben, ist bei einer Vielzahl an Genen bekannt und wird mit der Tumorgenese in Verbindung gebracht [3, 34, 44, 58]. Der Expressionsanstieg nach der vermeintlichen Demethylierung in Folge der Behandlung mit Aza zeigt sich in diesem kausalen Zusammenhang in den Ergebnissen der Bisulfitsequenzierung nur bei RH30.

Die Reduktion der Methylierungen in RMS13 fällt mit einem Unterschied von knapp 10% nur relativ gering aus. Allerdings zeigt sich nach Aza-Behandlung auch hier eine starke Reaktivierung der *BMP2*-Expression. Man kann sich also fragen, woher diese Reaktivierung kommt, wenn sich das Methylierungsmuster des Promotorbereichs kaum verändert. Es ist bekannt, dass Aza ein relativ unspezifisch wirkendes Agens ist, das einerseits zu einer DNA-Demethylierung führt und so eine ganze Reihe an Genen beeinflusst, andererseits aber auch Histone und deren Modifizierungen verändern kann [133, 134]. In Colonkarzinomzellen konnte gezeigt werden, dass Aza hauptsächlich zu einer globalen Demethylierung führt, die CpG-Inseln in Promotorbereichen aber teilweise kaum verändert werden. Dennoch wurde durch diese geringen Veränderungen der CpG-Inseln, die oft bestimmte Cytosine nahe des Transkriptionsstarts betreffen, eine starke Reaktivierung des jeweiligen Gens beobachtet [135]. Ähnliche Ergebnisse wurden für das *CDH1*-Gen in malignen Lebertumorzellen beschrieben [136]. Es kann also davon ausgegangen werden, dass nicht nur eine starke Demethylierung des Promotorbereichs, sondern auch eine Demethylierung bestimmter für die Transkription entscheidender Elemente ausreichend ist, die Expression des betroffenen Gens wieder anzuheben. Es gibt verschiedene Erklärungen für dieses Phänomen. Zum einen könnte eine sehr geringe Anzahl an CpG-Dinukleotiden entscheidend für die Transkription sein und allein schon eine Demethylierung dieser Gruppen zu einer Reexpression des Gens führen. Zum anderen könnte Aza auch Histonmodifikationen beeinflussen oder Transkriptionsfaktoren, die auch an methylierte DNA binden können, reaktivieren und somit ohne eine nennenswerte Demethylierung zu einer Reaktivierung des untersuchten Gens führen. Es ist wahrscheinlich, dass diese Mechanismen auch bei der Reaktivierung von *BMP2* in RMS13-Zellen eine Rolle spielen und damit die starke Reexpression trotz geringer Demethylierung erklärt werden kann [135, 136]. Da unsere Methylierungsanalyse nur einen Teil des *BMP2*-Promotorbereichs abdeckte, ist eine weitere Möglichkeit für die Reaktivierung die vermeintliche Demethylierung weiterer CpG-Dinukleotide, die weder von der Bisulfitsequenzierung noch von der MSP erfasst wurden.

Ähnliche epigenetische Abläufe sind wohl auch bei der embryonalen RMS-Zelllinie RD von Bedeutung. In der Bisulfitsequenzierung zeigte sich ein Methylierungsgrad von nur knapp 20% (nahezu unverändert nach Aza-Behandlung), die Genexpression steigt aber auch hier eklatant an nach der Behandlung mit Aza. Es wurde gezeigt, dass die Transkription von *BMP2* in Osteoblasten über regulatorische DNA-Elemente, sogenannte Enhancer, beeinflusst wird, die sich 156 Kilobasen upstream des Promotors befinden [137, 138]. Es wäre nun möglich, dass auch diese Elemente in Tumorgewebe über Methylierungen inaktiviert sind. Dies würde zu einer verminderten Expression von *BMP2* führen und damit zum einen die unterdrückte *BMP2*-Expression bei geringer Methylierung des Promotorbereichs der RD-Zellen und zum anderen auch die Reexpression nach Demethylierung erklären. Die oben genannten Mechanismen zur *BMP2*-Expression der Zelllinie RMS13 können hier zusätzlich eine Rolle spielen.

Ein weiterer Zusammenhang von Methylierung und Genexpression, welcher die Reexpression nach Aza-Behandlung erklären könnte, ist in Hinblick auf Transkriptionsfaktorbindestellen im Promotorbereich von *BMP2* zu finden. Es ist bekannt, dass die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA sequenzspezifisch ist und durch die Methylierung dieser Stellen verhindert bzw. erschwert werden kann [44]. So konnte auch gezeigt werden, dass die erfolgreiche Bindung von Transkriptionsfaktoren eine verstärkte Promotormethylierung verhindern kann und somit die Genexpression aufrechterhalten wird [103]. Man kann folglich davon ausgehen, dass spezifische Demethylierungen ausreichen könnten, die Bindung von Transkriptionsfaktoren wieder zu ermöglichen und dadurch die Genexpression anzuheben. Betrachtet man nun die von uns sequenzierten CpG-Dinukleotide und vergleicht sie mit den Bindestellen verschiedener Transkriptionsfaktoren, zeigen sich für die drei RMS-Zelllinien erneut interessante Ergebnisse. Da RMS13 keine Veränderung des Methylierungsmusters erfährt, kommt es auch zu keiner Änderung in Hinblick auf die Transkriptionsfaktorbindestellen. Im Gegensatz hierzu werden bei RH30 durch die starke Demethylierung auch alle Bindestellen demethyliert. Es ist also denkbar, dass dies hier mit der Grund für die gesteigerte Genexpression ist. Betrachtet man den sequenzierten DNA-Abschnitt der Zelllinie RD, fällt auf, dass nur eine Stelle, welche für die Bindung von GATA-1 wichtig ist, im solvent-Zustand in knapp der Hälfte der Fälle methyliert ist, wohingegen nach Behandlung mit Aza eine komplette Demethylierung auftritt (Abbildung 11). GATA-1 ist dafür bekannt, ein wichtiger Transkriptionsfaktor bei der hämatopoetischen Proliferation und Differenzierung zu sein. So kann ein Verlust der Funktion dieses Gens zur Entstehung verschiedener Leukämien beitragen [139]. Passend dazu konnte auch gezeigt werden, dass *GATA-1* eine tragende Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus einnimmt. So führte eine Rekonstitution von *GATA-1* in *GATA-1*⁻-Erythroblasten zu einer verstärkten Expression verschiedener Wachstumsinhibitoren wie *p18*^{*INK4C*}, *p27*^{*Kip1*}, *BTG2* oder *HIPK2*

sowie zu einer Repression von mitogenen Genen wie *CDK6* oder *MYC* [140]. In Anbetracht dieser antiproliferativen Effekte könnte GATA-1 nun auch bei der Zelllinie RD eine Rolle in der Tumorgenese spielen. Geht man davon aus, dass die Bindung von GATA-1 durch die Methylierung seiner Bindestelle im *BMP2*-Promotor erschwert wird und dadurch die *BMP2*-Expression vermindert ist, würde dies durch das Fehlen der antiproliferativen Eigenschaften von *BMP2* zu einem verstärktem Tumorwachstum führen. Diese Regulation von *BMP2* über GATA-1 würde zu einer niedrigen *BMP2*-Expression in den RD-Zellen und nach Aza-Behandlung mit Demethylierung der GATA1-Bindestelle zu der Reaktivierung führen, welche wir in unseren Experimenten beobachten konnten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass *BMP2* wahrscheinlich als epigenetisch reguliertes Gen in RMS identifiziert werden konnte, wobei es in den beiden alveolären Zelllinien RH30 und RMS13 über eine Promotorhypermethylierung herabreguliert ist, wohingegen dieses Gen in der embryonalen Zelllinie RD eher nur über distinkte Methylierungsveränderungen im Promotorbereich oder Veränderungen an anderen für die Transkription wichtigen DNA-Stellen supprimiert ist. Die Behandlung mit Aza führt zu einer Reaktivierung von *BMP2* in allen Zelllinien auf ein Niveau der Expression in gesundem Muskelgewebe, allerdings gehen die Mechanismen, die hierfür verantwortlich sind, vermutlich weit über die reine Demethylierung des Promotorbereiches hinaus.

6.2 Reaktivierung von *BMP2* in RMS Zelllinien

Da *BMP2* in den RMS-Zelllinien im Gegensatz zu gesundem Muskelgewebe nicht exprimiert wird, war das nächste Ziel *BMP2* in den Tumorzellen zu reaktivieren und im Folgenden die Auswirkungen auf Zellproliferation, Apoptoseverhalten und Zielgenexpression zu untersuchen. Es konnte in einer ganzen Reihe an malignen Tumoren, in welchen ein Verlust der *BMP2*-Expression vorliegen kann, wie dem Medulloblastom [93], dem Prostatakarzinom [88], dem Magenkarzinom [97, 106], dem Mammakarzinom [91], dem Kolonkarzinom [95, 96] und dem Nebennierenrindenkarzinom [90], gezeigt werden, dass eine Reaktivierung des *BMP2*-Signalweges über Behandlung mit rekombinantem *BMP2* zu einer Proliferationshemmung der Tumorzellen führt. Auch eine Induktion der Apoptose konnte beispielsweise in Plasmozytom-Zellen erreicht werden [92]. Untersuchungen an glatten Muskelzellen, die auch auf die rh*BMP2*-Behandlung oder den genetischem *BMP2*-Transfer mit einer Einschränkung der Proliferation reagierten [107, 129], bekräftigten die Erwartung auf ähnliche Ergebnisse bei einer *BMP2*-Reaktivierung in RMS-Zelllinien.

In den drei Zelllinien RD, RH30 und RMS13 wurde eine Reaktivierung von *BMP2* zum einen über die transiente Transfektion mit den Expressionsplasmiden pIRES-EGFP+*BMP2* und pcDNA3.1+*BMP2*, zum anderen auch direkt über die Behandlung mit rh*BMP2* erreicht. In

dem MTT-Proliferationsassay zeigte sich sowohl bei transfizierten, als auch den mit Protein behandelten Zellen, eine deutliche Abnahme des Zellwachstums über die Zeit mit signifikanten Werten bei 72h (Abbildung 13). Durch die rhBMP2-Behandlung konnten allerdings eindeutigere Effekte erzielt werden als bei den Tumorzellen nach transients Transfektion. Ein Grund dafür könnte sein, dass rhBMP2 direkt an die entsprechenden Rezeptoren binden kann, den Signalweg dadurch in Gang setzt und die komplizierten Mechanismen der Transkription und Translation umgangen werden, welche eventuell nur eine sehr geringe Menge an BMP2-Protein liefern könnten. Auch werden durch diese Stimulation der Zellen mit rhBMP2 nahezu alle Zellen erreicht, wohingegen die transiente Transfektion nur eine Effizienz von ca. 20% erzielte. Ein weiterer wichtiger Grund allerdings ist, dass rhBMP2 auch über Autoregulation die *BMP2*-Expression stimulieren kann und es deshalb zu einer weiteren Verstärkung der Aktivierung des BMP2-Signalweges kommt [141]. Zusammenfassend zeigt dies, dass auch in RMS, ebenso wie bei den oben genannten Tumoren, die Zellproliferation über eine Rekonstitution der *BMP2*-Expression inhibiert werden kann. Im Umkehrschluss kann davon ausgegangen werden, dass mit dem Fehlen der *BMP2*-Expression ein wichtiger Regulationsmechanismus des Zellwachstums in den Tumorzellen wegfällt und somit das Wachstum des RMS hierdurch mitbegünstigt wird.

Neben diesen Auswirkungen einer erhöhten *BMP2*-Expression auf das Wachstum der RMS-Zelllinien, sollte nun auch das Apoptoseverhalten analysiert werden. Eine Hemmung der Proliferation durch rhBMP2 wurde schon früher mit einer gesteigerten Apoptose in Verbindung gebracht. So erfahren Myelomzellen nach rhBMP2-Behandlung vermehrt einen G1-Phase-Arrest mit anschließender Apoptose [142]. Des Weiteren konnte rhBMP2 auch in sympathoadrenergen Vorläuferzellen und, wie auch schon bei der Proliferationshemmung, in glatten Muskelzellen apoptotische Vorgänge auslösen und somit zum Zelltod führen [143, 144]. Allerdings gibt es auch hier gegensätzliche Hinweise. BMP2 kann beispielsweise in Brustkrebszellen die Expression von *ID1* - *ID3*, welche für eine Apoptose-Induktion bekannt sind, erhöhen. Dies führt aber entgegen der Erwartung nicht zu einer gesteigerten Apoptose, sondern hält die Zellen wahrscheinlich in einem leicht zu beeinflussenden Zustand, der je nach weiteren Signalen, pro- oder antapoptotische Richtungen einschlagen kann [145, 146]. In einer anderen Arbeit konnte sogar eine Abschwächung der Apoptose durch BMP2 beobachtet werden [147]. Man sieht also auch in diesem Fall, dass *BMP2* sehr unterschiedliche Rollen spielen kann, je nach betroffenem Gewebe und aktuellen Umgebungsbedingungen. Das Apoptoseverhalten wurde mittels eines Annexin V-Calcein-Assays quantifiziert. Für die Zelllinien RD und RMS13 zeigte sich unter BMP2-Stimulierung zu allen Zeitpunkten nur eine marginale Steigerung desjenigen Anteils an Zellen, die sich in der frühen Apoptose befanden. Auch bei RH30 konnte bei 24h und 48h nur ein geringer prozentualer Apoptoseanstieg nach Behandlung mit rhBMP2 beobachtet werden. Allerdings

stieg der Anteil an apoptotischen Zellen bei 72h Behandlung von 4,8% in unbehandeltem Zustand auf 16,7% mit rhBMP2 an (Abbildung 14). Es zeigte sich aber dennoch bei allen drei Zelllinien eine starke Abnahme der vitalen Zellen nach rhBMP2-Behandlung in Bezug auf die Werte bei unbehandelten Zellen im Verlauf über die Zeit (Abbildung 15). Daher kann davon ausgegangen werden, dass rhBMP2 zu einem verstärkten Zelluntergang führt, obwohl in unseren Versuchen nur eine geringe Induktion (außer bei RH30) der frühen Apoptose beobachtet werden konnte. Es scheint also, dass es, in Übereinstimmung mit oben genannten Ergebnissen aus der Literatur, auch in RMS durch Behandlung der Zellen mit rhBMP2 teilweise zu einem Anstieg der Apoptose kommen kann. Allerdings ist dieser zu gering, um die starke Abnahme der vitalen Zellen in den drei Zellkulturen zu erklären. Wie könnte nun diese scheinbare Diskrepanz zustande kommen?

Zum einen ist es möglich, dass die Phase, in der wir in unserem Assay die Zellen der frühen Apoptose detektierten, d.h. bei dem die Zellen sowohl Annexin V-, als auch Calcein-positiv sein sollten, zu kurz ist oder früher ablief, als bei unseren Zeitpunkten gemessen, und somit von unseren Messungen verpasst wurde. Um die klassische Apoptose sicher zu bestätigen, müsste man noch weitere Versuche, wie eine Analyse der Zellmorphologie, TUNEL-Assay oder Ähnliches, durchführen. Neue Erkenntnisse zeigen jedoch, dass die Apoptose im klassischen Sinn, d.h. durch Caspasen vermittelt, nur eine von vielen Formen des programmierten Zelltodes ist. So gibt es bis zu 9 weitere genetisch programmierte Mechanismen, wie die Autophagie, die Anoikis oder die Caspase-unabhängige Apoptose (CICD), die letztendlich zum Zelltod führen [148]. Diese unterscheiden sich zwar in manchen Bereichen von der Apoptose, allerdings haben sie auch viel mit dieser gemeinsam. Bei der CICD beispielsweise findet man wie auch bei der Apoptose eine Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran, eine Chromatinkondensierung mit Zellkernschrumpfung und eine Proliferationsabnahme. Auf der anderen Seite fehlt meistens die Externalisierung von Phosphatidylserinen, was zu Annexin V-negativen Zellen führt [149-151]. Es gibt einige Hinweise, die zu der Annahme führen, dass CICD auch in RMS nach rhBMP2-Behandlung eine Rolle spielen kann. Da Zellen, die durch CICD zu Grunde gehen, in unserem Annexin V-Calcein-Assay durch die fehlenden Oberflächenmarker nicht zu detektieren sind, könnte hierdurch die Diskrepanz zwischen geringer klassischer Apoptose und dennoch starker Abnahme der vitalen Zellen erklärt werden. Ähnliches ist auch in anderen malignen Erkrankungen bekannt. Eine Reihe von Tumoren exprimiert beispielsweise den endogenen Caspase-Inhibitor *XIAP*, welcher zu einer Unterdrückung der klassischen Apoptose führt und somit das Tumorwachstum mitbegünstigt [149, 152-154]. In Tumorzellen konnte unter *XIAP*-Expression nach Behandlung mit Chemotherapeutika die Inhibition der klassischen Apoptose beobachtet werden, allerdings gingen die Zellen dennoch zugrunde und zwar über den Mechanismus der CICD [155]. Interessanterweise spielt *XIAP* wohl auch in der BMP2/4-

Signaltransduktion bei der embryonalen Entwicklung eine nicht unerhebliche Rolle. So gibt es Hinweise, dass neben dem klassischen BMP/Smad-Signalweg noch ein alternativer Signalweg existiert, welcher über MAP-Kinasen vermittelt wird [73]. In diesem kann *XIAP* intrazellulär mit dem aktivierten BMP-Rezeptorkomplex assoziieren und die Verbindung zu der MAP-Kinase TAK1 herstellen. *XIAP* wirkt hierbei als positiver Regulator und führt folglich über Coproteine zu einer Abschwächung der Apoptose [156]. Fasst man diese Ergebnisse zusammen, zeigt sich eine hohe Wahrscheinlichkeit dafür, dass *XIAP* auch in RMS über bestimmte Wechselwirkungen im BMP-Signaling zu einer Unterdrückung der klassischen Caspase-abhängigen Apoptose führt. Da der Zelluntergang dennoch zu beobachten ist, liegt die Vermutung nahe, dass dies über die CICD geschieht und somit die Inhibition durch *XIAP* über die erhöhte Expression von *BMP2* und die damit verstärkte Aktivierung des BMP2/Smad-Signalweges umgangen werden kann. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass rhBMP2 in RMS zu einem verstärkten Zelluntergang führt, dies wahrscheinlich aber nur zu einem geringen Teil über die klassische Apoptose (beispielsweise bei RH30) und hauptsächlich über Mechanismen wie der CICD geschieht.

Um zu zeigen, dass die Effekte von rhBMP2 auf Proliferation und Apoptose über den BMP-Signalweg vermittelt werden können, wurde neben dem Rezeptornachweis (siehe oben) auch die Expression einiger BMP-Zielgene ermittelt. Die für die Inhibitoren der Differenzierung (ID) kodierenden Gene *ID1-4* sind hierbei einige der wichtigsten Gene, die mit einer Regulation durch *BMP2* in Verbindung gebracht wurden. Diese Gene sind von großer Bedeutung in der Zellzykluskontrolle, -differenzierung und auch -apoptose. In einer ganzen Reihe an verschiedenen Zelltypen konnte nachgewiesen werden, dass eine Behandlung mit BMP2 zu einer Steigerung der Expression dieser Gene führt [76, 77, 145, 157-159]. In unseren Zelllinien wurden *ID1* und *ID3* näher analysiert. Für *ID1* konnte eine deutliche Zunahme der Expression nach rhBMP2-Behandlung nur in der Zelllinie RH30 erreicht werden, *ID3* zeigte diesen Expressionsanstieg sowohl für RH30, als auch für RMS13 (Abbildung 16). Interessanterweise wurde in Fibroblasten eine gesteigerte Expression der Gene *ID1-3* mit einer Steigerung der Apoptose in Verbindung gebracht [146]. Da nur in RH30 beide dieser untersuchten Gene nach rhBMP2-Behandlung überexprimiert wurden, könnte dies ein Grund dafür sein, dass auch nur in dieser einen Zelllinie ein Apoptoseanstieg zu sehen war.

Neben diesen Zielgenen des *BMP2*-Signalweges wurden des Weiteren die Gene *IGF2*, *IGFBP3* und *IGF1R* untersucht. Es ist bekannt, dass der Wachstumsfaktor *IGF2* in RMS, im Gegensatz zu gesundem Muskelgewebe, häufig durch den Verlust der parentalen Prägung und Heterozygotie überexprimiert ist [160, 161]. Zusätzlich hierzu zeigt das für den entsprechenden IGF2-Rezeptor kodierende Gen *IGF1R* ebenso eine erhöhte Expression in RMS-Gewebe und auch in den RMS-Zelllinien RD und RH30 [28]. Es wird folglich davon

ausgegangen, dass *IGF2* in RMS als Wachstums- und Motilitätsfaktor anzusehen ist, der das Tumorstadium entscheidend mitbegünstigt [28, 162]. So führt eine Unterbrechung der *IGF2*-Signalkaskade durch Blockierung des *IGF1R*-Rezeptors sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu einer verminderten Proliferation der RMS-Tumorzellen [163-165]. Da wir in unseren Experimenten eine Hemmung der Proliferation nach rhBMP2-Behandlung beobachten konnten, wollten wir untersuchen, ob diese Einschränkung des Zellwachstums auch über eine Beeinflussung der Expression von *IGF2* und *IGF1R* vermittelt ist. Zusätzlich wurde *IGFBP3*, kodierend für ein Bindeprotein von IGF2, analysiert, welches teilweise proapoptotische und Wachstums-inhibierende Effekte innehat [166]. Wie erwartet zeigte sich sowohl für *IGF2* als auch *IGF1R* eine starke Expression in jeder der drei Zelllinien. Allerdings konnte durch die Behandlung mit rhBMP2 keine signifikante Reduktion der Expression dieser beiden Gene erreicht werden. Auch die Expression von *IGFBP3*, welche bei RH30 und RMS13 nicht vorhanden war und bei RD nur sehr geringe Werte im Vergleich zu denjenigen der beiden anderen Gene erreichte, wurde durch rhBMP2 nicht verändert (Abbildung 17). Es liegt folglich nahe, dass die proliferationshemmenden Effekte von BMP2 nicht durch eine Beeinflussung des *IGF2/IGF1R/IGFBP3*-Systems zustande kommen, sondern wahrscheinlich über andere Mechanismen vermittelt werden.

Als weitere potentielle Zielgene und Marker für die Proliferation wurden die Cyclin-dependent-kinase-inhibitor-Gene *CDKN1A* (*p21*), *CDKN2A* (*p16*) und *CDKN2B* (*p15*) genauer analysiert. Diese Gene spielen eine wichtige Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus und den Eintritt der Zellen in die G1-Phase [167]. Es konnte beobachtet werden, dass nach BMP2-Stimulation der Zellzyklusinhibitor *p21* (*CDKN1A*) induziert wird, ein gesteigertes Proteinlevel aufwies und dadurch die Anzahl der Zellen in der G1-Phase erhöht wurde [91, 106]. Dieser Mechanismus der Inhibierung der Zellproliferation von BMP2 via *p21* wurde auch in nicht-kanzerösem Gewebe, in diesem Fall in glatten Muskelzellen, nachgewiesen [107, 129]. Die hier untersuchten Gene stellten deshalb zusätzlich eine vermeintliche Informationsquelle zur Aufklärung der antiproliferativen Komponente von *BMP2* dar. Eine Expressionssteigerung dieser Zellzyklusinhibitoren, wie oben beschrieben, konnte in unseren Experimenten allerdings nur signifikant in der embryonalen Zelllinie RD erreicht werden und hier auch für alle drei der untersuchten Gene (Abbildung 18). Dies weist darauf hin, dass zumindest in RD-Zellen die Proliferationshemmung durch rhBMP2 auch auf einer Beeinflussung des Zellzyklus beruhen könnte.

Fasst man die Ergebnisse der Zielgenexpression, d.h. die Expressionssteigerung von *ID1* und *ID3* sowie *CDKN1A* nach rhBMP2-Behandlung zusammen, zeigt sich, dass in jeder der drei Zelllinien, von zumindest einem dieser Gene, ein Anstieg der Expression erreicht werden konnte. Dies festigt die Behauptung, neben dem Vorliegen eines intakten BMP2-Rezeptors, dass der BMP2-Signalweg intakt ist und die entsprechenden Zielgene aktiviert

werden können. Eine Beeinflussung des *IGF2*-Systems durch rhBMP2 liegt in unseren Experimenten allerdings nicht vor.

6.3 Mögliche Auswirkungen dieser Ergebnisse auf eine Verbesserung der Therapie des RMS und Zusammenhang mit anderen Signalwegen

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die wahrscheinlich epigenetisch vermittelte Stilllegung von *BMP2* in RMS ein zusätzlich begünstigender Faktor der Tumorgenese ist und eine Reaktivierung dieses Gens zu einem eingeschränkten Tumorstadium mit erhöhtem Zelluntergang führen kann. Daher liegt die Annahme nahe, dass auch eine Reaktivierung des *BMP2*-Signalweges in RMS eine Verminderung der Tumormasse nach sich zieht und hierdurch die Therapie verbessert werden könnte. *BMP2* findet schon seit geraumer Zeit über seine osteoinduktive Wirkung in der Behandlung von Knochendefekten eine wichtige Anwendung. So wird dieses Protein dazu eingesetzt, die Knochenheilung zu beschleunigen, segmentale Knochendefekte zu überbrücken oder um spinale Fusionen zu erreichen [168-170]. Hierbei wird meist rhBMP2 verabreicht, entweder in Kombination mit einer Matrix, wie beispielsweise einem Schwamm bestehend einerseits aus körpereigenen Substanzen (Kollagen, Fibrin etc.), andererseits aus synthetischen Polymeren, oder direkt ohne bestimmten Trägerstoff [168, 170, 171]. Auch der genetische Transfer von *BMP2* über nicht-virale und virale Methoden führt in Tiermodellen zu ähnlichen Ergebnissen, wird aber in der klinischen Praxis bis jetzt noch nicht eingesetzt. Der *BMP2*-Vektor kann bei diesem Ansatz entweder direkt injiziert werden oder über die Implantation von „ex vivo“ - transduzierten Zellen (auch Muskelzellen) in das Zielgewebe eingebracht werden [172-175]. Diese sehr ausgereiften Behandlungsmethoden könnten nun auch in der RMS-Therapie von Nutzen sein. Ein Ansatz wäre beispielsweise *BMP2*-Schwämme postoperativ in die verbleibende Tumorkavität einzubringen, dadurch maligne Überreste des RMS in ihrem Wachstum zu unterdrücken und somit das Rückfallrisiko zu minimieren. Die Injektion von *BMP2*-Vektoren direkt in den Tumor könnte des Weiteren bei inoperablen Tumoren als Ergänzung zu der konventionellen Chemotherapie oder als neoadjuvantes Downgrading verwendet werden. Ein Vorteil dieser Herangehensweise wäre die geringe Invasivität des Eingriffes und auch eine länger anhaltende Expression von *BMP2* in den Tumorzellen gegenüber der geringen Halbwertszeit von rhBMP2 in einer Schwammapplikation [176]. Ebenso wäre eine Kombination beider Verfahren denkbar. Es könnte natürlich bei diesen Methoden, wie auch bei den orthopädischen Anwendungen, zu einer Bildung von ektopen Knochen in Muskelgewebe kommen. Allerdings ist diese Knochenbildung einerseits nicht immer vorhanden, sondern teilweise von weiteren Faktoren,

wie dem Vorhandensein von Phosphaten, abhängig [177], und andererseits in Anbetracht der Tatsache, dass das Tumorwachstum verringert wird, wohl auch zu tolerieren.

Neben dem BMP2-Signalweg ist auch der sogenannte Hedgehog-Signalweg (*SHH*-Signalweg) ein äußerst wichtiger Regulator in der embryonalen Entwicklung, welcher Proliferation und Differenzierung verschiedenster körpereigener Gewebe beeinflussen kann [178]. Eine Deregulation dieses Signalweges wurde mit einer ganzen Reihe an Tumoren und deren Entstehung in Verbindung gebracht [179-181]. Auch bei RMS sind solche Veränderungen beschrieben. So zeigen diese Tumoren oft eine aberrante Aktivierung des *SHH*-Signalweges mit einer stark erhöhten Expression der *SHH*-Zielgene *PTCH1* und *GLI1* [180, 182]. Die Arbeitsgruppe Zibat et al. konnte die starke Hedgehog-Aktivierung mit erhöhter Zielgenexpression vor allem den embryonalen und den Fusionsgen-Negativen (ohne *PAX3/7-FKHR*) alveolären RMS zuordnen, welche auch eine geringere Differenzierung aufwiesen. Die Patientengruppe der Fusionsgen-Negativen alveolären RMS zeigte hierbei verminderte Überlebensraten. Dies legt den Verdacht nahe, dass eine starke *SHH*-Aktivierung mit aggressiveren Tumorsubtypen vergesellschaftet ist [183]. In einem für *Ptch1* heterozygoten Mausmodell (*Ptch1^{neo67/+}*-Mäuse) konnte eine hohe Inzidenz für die Entstehung von Medulloblastomen und RMS mit *Gli1*-Überexpression nachgewiesen werden [184, 185]. Obwohl beim Menschen die meisten RMS sporadisch auftreten, wurde auch hier ein Zusammenhang zu dieser Mutation in vereinzelten Fällen festgestellt [186, 187]. Man kann folglich davon ausgehen, dass dem *SHH*-Signalweg in der RMS-Genese eine hohe Bedeutung zukommt.

Es ist bekannt, dass die Behandlung von Medulloblastomzellen mit rhBMP2 zu einer verminderten Proliferation und erhöhten Differenzierung dieses Tumors führen kann. Hierbei spielt der *SHH*-Signalweg sowohl für die Entstehung und Progression des Medulloblastoms [188], als auch für diesen über rhBMP2 vermittelten antiproliferativen Effekt eine entscheidende Rolle [93]. Der durch einen aktiven *SHH*-Signalweg induzierte Transkriptionsfaktor ATOH1 ist in dieser rhBMP2-vermittelten Proliferationshemmung von großer Bedeutung. RhBMP2 führt zu einer Herabregulierung des ATOH1-Proteinlevels, allerdings nicht über eine Hemmung des *SHH*-Signalwegs, sondern über posttranskriptionelle Mechanismen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine adäquate Expression von ATOH1 für die *SHH*-vermittelte Zellproliferation benötigt wird und eine verminderte Expression dieses Transkriptionsfaktors zum beobachteten Zellzyklusarrest führt [93]. Die Behandlung mit Cyclopamin, einem pflanzlichen Agens, welches den *SHH*-Signalweg blockiert, antikanzerogene Eigenschaften hat und somit in der Behandlung von malignen Erkrankungen zum Einsatz kommt [189, 190], führte ebenso zu einer Proliferationshemmung der Medulloblastomzellen und zu einer erniedrigten ATOH1-Expression. Interessanterweise konnte man nachweisen, dass sich Cyclopamin und in

diesem Fall auch BMP4 (in Struktur und Funktion sehr ähnlich zu BMP2) in ihrer antiproliferativen Wirkung auf Medulloblastomzellen verstärkten und sich die gleichen Effekte bei niedrigeren Wirkstoffdosierungen in einer Kombinationstherapie einstellten wie bei den weitaus höheren Dosierungen der Einzelbehandlungen [93].

Da das Medulloblastom, ebenso wie das RMS zu den embryonalen Tumoren gezählt wird, der *SHH*-Signalweg in beiden Tumorentitäten von Bedeutung ist und rhBMP2 zu einer Proliferationshemmung der Tumorzellen führt, kann zusammenfassend vermutet werden, dass auch im RMS diese Verminderung des Zellwachstums über eine Beeinflussung des *SHH*-Signalweges durch rhBMP2 zustande kommt. Weiterhin sind im RMS ähnliche Studien über die Wirksamkeit von Cyclopamin auf die Unterdrückung des Tumorwachstums vorhanden. So konnte *in vitro* sowohl eine Unterdrückung des *SHH*-Signalweges als auch des Zellwachstums erreicht werden. *In vivo* wurden diese Ergebnisse allerdings nicht bestätigt, da sich zwar eine leichte Hemmung des *SHH*-Signalweges feststellen lies, das Tumorwachstum aber nicht beeinflusst wurde [191]. In diesem Fall könnte durch eine Kombinationstherapie von Cyclopamin mit rhBMP2 die Hemmung auf die über *SHH* vermittelten kanzerogenen Mechanismen verstärkt werden und so eventuell auch *in vivo* eine Unterdrückung des RMS-Wachstums erreicht werden. Dieser Ansatz einer Kombinationstherapie mit rhBMP2 könnte ebenfalls in Hinblick auf eine Behandlung von RMS mit Betulinsäure interessant sein. Betulinsäure führt in RMS-Zellen zu erhöhten Apoptoseraten und zusätzlich zu einer Inhibition des *SHH*-Signalweges [192]. Es wäre also möglich, dass auch in diesem Fall durch eine Kombination von Betulinsäure mit rhBMP2 eine Reduktion der Wirkstoffdosis, mit dennoch gleichbleibendem Effekt auf den Tumor, durchgeführt werden kann und somit die Nebenwirkungen einer Chemotherapie drastisch reduziert werden.

Insgesamt kann also vermutet werden, dass die Behandlung des RMS mit BMP2, einerseits über die schon in der Orthopädie etablierten Systeme, andererseits in Wechselwirkung mit dem *SHH*-Signalweg und dessen Inhibitoren, zu erhöhten Heilungsraten und somit auch neuen und verbesserten Therapieansätzen führen könnte.

7 Zusammenfassung

Die Rolle epigenetischer Veränderungen bei der Entstehung von kindlichen Tumoren der Skelettmuskulatur ist noch weitestgehend unbekannt. Deshalb sollten im Rahmen dieser Arbeit Gene identifiziert und funktionell charakterisiert werden, die durch eine fehlerhafte DNA-Methylierung stillgelegt sind. Durch den Einsatz einer Screeningmethode konnten wir *BMP2* als ein Kandidatengen beschreiben, dessen Expression in RMS-Zelllinien gegenüber derjenigen in gesundem Muskelgewebe stark vermindert ist. Eine entsprechende Promotorhypermethylierung konnte in 2 von 3 Zelllinien nachgewiesen werden.

Bei der Zelllinie RD kommt die Repression der Genexpression wahrscheinlich eher über diskrete Methylierungen unter anderen an spezifischen Bindestellen von Transkriptionsfaktoren, wie z.B. GATA1, zustande. Die Behandlung mit dem demethylierenden Agens Aza führte zu einer Reexpression von *BMP2* auf Werte in gesundem Muskelgewebe, eine deutliche Demethylierung konnte jedoch nur bei RH30 erreicht werden. Für diese Expressionssteigerung von *BMP2* nach Aza-Behandlung ist wahrscheinlich nicht nur die direkte Demethylierung großer Abschnitte des Promotorbereiches verantwortlich, sondern eher diskrete Veränderungen des Methylierungsmusters bestimmter für die Transkription entscheidender Elemente.

Die Rekonstitution von *BMP2* in den RMS-Zelllinien über transiente Transfektion und Behandlung mit rekombinantem BMP2 führte, bei dem Nachweis eines intakten BMP2/Smad-Signalweges, zu einer signifikanten Proliferationsabnahme. Eine Steigerung der Apoptose konnte nur bei RH30 erreicht werden, allerdings kam es bei allen drei Zelllinien unter rhBMP2-Behandlung zu einer Abnahme des Anteils an vitalen Zellen über die Zeit. In Übereinstimmung mit Daten aus der Literatur kann davon ausgegangen werden, dass hier möglicherweise die Caspase-unabhängige Apoptose eine Rolle spielt. Die Auswirkung einer Rekonstitution von *BMP2* auf die Expression bestimmter Zielgene, lieferte einerseits einen weiteren Hinweis auf die Intaktheit des BMP2/Smad-Signalweges und andererseits die Vermutung, dass zumindest bei der Zelllinien RD die Proliferationshemmung über einen G1-Phase-Arrest zustande kommen könnte. Eine Beeinflussung des IGF2-Systems durch *BMP2* scheint nicht vorhanden zu sein.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse kann abschließend davon ausgegangen werden, dass *BMP2* wohl eine antiproliferative Komponente besitzt, welche bei der Entstehung und dem Wachstum von RMS von entscheidender Bedeutung ist. Durch die Behandlung von RMS durch BMP2, auch in Zusammenhang mit dem SHH-Signalweg, könnten neue verbesserte Therapieverfahren für das RMS konzipiert und somit möglicherweise auch die Überlebensraten verlängert werden.

8 Literaturverzeichnis

1. Kaatsch, P., *Epidemiology of childhood cancer*. Cancer Treat Rev, 2010. **36**(4): p. 277-85.
2. Loeb, L.A., *A mutator phenotype in cancer*. Cancer Res, 2001. **61**(8): p. 3230-9.
3. Esteller, M., *Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome*. Hum Mol Genet, 2007. **16 Spec No 1**: p. R50-9.
4. Harada, K., et al., *Aberrant promoter methylation and silencing of the RASSF1A gene in pediatric tumors and cell lines*. Oncogene, 2002. **21**(27): p. 4345-9.
5. Hogan, B.L., *Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development*. Genes Dev, 1996. **10**(13): p. 1580-94.
6. Paulino, A.C. and M.F. Okcu, *Rhabdomyosarcoma*. Curr Probl Cancer, 2008. **32**(1): p. 7-34.
7. Xia, S.J., J.G. Pressey, and F.G. Barr, *Molecular pathogenesis of rhabdomyosarcoma*. Cancer Biol Ther, 2002. **1**(2): p. 97-104.
8. McDowell, H.P., *Update on childhood rhabdomyosarcoma*. Arch Dis Child, 2003. **88**(4): p. 354-7.
9. Hayes-Jordan, A. and R. Andrassy, *Rhabdomyosarcoma in children*. Curr Opin Pediatr, 2009. **21**(3): p. 373-8.
10. Maurer, H.M., et al., *The Intergroup Rhabdomyosarcoma Study-I. A final report*. Cancer, 1988. **61**(2): p. 209-20.
11. Maurer, H.M., et al., *The Intergroup Rhabdomyosarcoma Study-II*. Cancer, 1993. **71**(5): p. 1904-22.
12. Crist, W., et al., *The Third Intergroup Rhabdomyosarcoma Study*. J Clin Oncol, 1995. **13**(3): p. 610-30.
13. Breneman, J.C., et al., *Prognostic factors and clinical outcomes in children and adolescents with metastatic rhabdomyosarcoma--a report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study IV*. J Clin Oncol, 2003. **21**(1): p. 78-84.
14. Horn, R.C., Jr. and H.T. Enterline, *Rhabdomyosarcoma: a clinicopathological study and classification of 39 cases*. Cancer, 1958. **11**(1): p. 181-99.
15. Qualman, S.J., et al., *Intergroup Rhabdomyosarcoma Study: update for pathologists*. Pediatr Dev Pathol, 1998. **1**(6): p. 550-61.
16. Meyer, W.H. and S.L. Spunt, *Soft tissue sarcomas of childhood*. Cancer Treat Rev, 2004. **30**(3): p. 269-80.
17. Parham, D.M. and J.J. Jenkins, 3rd, *Pathology of selected pediatric embryonal neoplasms*. Mod Pathol, 1994. **7**(4): p. 501-19.
18. Newton, W.A., Jr., et al., *Histopathology of childhood sarcomas, Intergroup Rhabdomyosarcoma Studies I and II: clinicopathologic correlation*. J Clin Oncol, 1988. **6**(1): p. 67-75.
19. Agamanolis, D.P., S. Dasu, and C.E. Krill, Jr., *Tumors of skeletal muscle*. Hum Pathol, 1986. **17**(8): p. 778-95.
20. Neville, H.L., et al., *Preoperative staging, prognostic factors, and outcome for extremity rhabdomyosarcoma: a preliminary report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study IV (1991-1997)*. J Pediatr Surg, 2000. **35**(2): p. 317-21.
21. Douglass, E.C., et al., *Alveolar rhabdomyosarcoma with the t(2;13): cytogenetic findings and clinicopathologic correlations*. Med Pediatr Oncol, 1993. **21**(2): p. 83-7.
22. Barr, F.G., *Gene fusions involving PAX and FOX family members in alveolar rhabdomyosarcoma*. Oncogene, 2001. **20**(40): p. 5736-46.
23. Yang, P., et al., *Association of childhood rhabdomyosarcoma with neurofibromatosis type I and birth defects*. Genet Epidemiol, 1995. **12**(5): p. 467-74.
24. Smith, A.C., et al., *Association of alveolar rhabdomyosarcoma with the Beckwith-Wiedemann syndrome*. Pediatr Dev Pathol, 2001. **4**(6): p. 550-8.
25. Malkin, D., et al., *Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms*. Science, 1990. **250**(4985): p. 1233-8.

26. Scrable, H.J., et al., *Chromosomal localization of the human rhabdomyosarcoma locus by mitotic recombination mapping*. Nature, 1987. **329**(6140): p. 645-7.
27. Loh, W.E., Jr., et al., *Human chromosome 11 contains two different growth suppressor genes for embryonal rhabdomyosarcoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(5): p. 1755-9.
28. El-Badry, O.M., et al., *Insulin-like growth factor II acts as an autocrine growth and motility factor in human rhabdomyosarcoma tumors*. Cell Growth Differ, 1990. **1**(7): p. 325-31.
29. Sorensen, P.H., et al., *PAX3-FKHR and PAX7-FKHR gene fusions are prognostic indicators in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the children's oncology group*. J Clin Oncol, 2002. **20**(11): p. 2672-9.
30. Pappo, A.S., et al., *Biology and therapy of pediatric rhabdomyosarcoma*. J Clin Oncol, 1995. **13**(8): p. 2123-39.
31. Fredericks, W.J., et al., *The PAX3-FKHR fusion protein created by the t(2;13) translocation in alveolar rhabdomyosarcomas is a more potent transcriptional activator than PAX3*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(3): p. 1522-35.
32. Crist, W.M., et al., *Intergroup rhabdomyosarcoma study-IV: results for patients with nonmetastatic disease*. J Clin Oncol, 2001. **19**(12): p. 3091-102.
33. Goldberg, A.D., C.D. Allis, and E. Bernstein, *Epigenetics: a landscape takes shape*. Cell, 2007. **128**(4): p. 635-8.
34. Herman, J.G. and S.B. Baylin, *Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation*. N Engl J Med, 2003. **349**(21): p. 2042-54.
35. Rakyan, V.K., et al., *Transgenerational inheritance of epigenetic states at the murine Axin(Fu) allele occurs after maternal and paternal transmission*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(5): p. 2538-43.
36. Morgan, H.D., et al., *Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse*. Nat Genet, 1999. **23**(3): p. 314-8.
37. Kornberg, R.D. and Y. Lorch, *Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome*. Cell, 1999. **98**(3): p. 285-94.
38. Peterson, C.L. and M.A. Laniel, *Histones and histone modifications*. Curr Biol, 2004. **14**(14): p. R546-51.
39. Cheung, P. and P. Lau, *Epigenetic regulation by histone methylation and histone variants*. Mol Endocrinol, 2005. **19**(3): p. 563-73.
40. Jenuwein, T. and C.D. Allis, *Translating the histone code*. Science, 2001. **293**(5532): p. 1074-80.
41. Felsenfeld, G. and M. Groudine, *Controlling the double helix*. Nature, 2003. **421**(6921): p. 448-53.
42. Ehrlich, M., et al., *Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells*. Nucleic Acids Res, 1982. **10**(8): p. 2709-21.
43. Antequera, F. and A. Bird, *Number of CpG islands and genes in human and mouse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(24): p. 11995-9.
44. Bird, A., *DNA methylation patterns and epigenetic memory*. Genes Dev, 2002. **16**(1): p. 6-21.
45. Gardiner-Garden, M. and M. Frommer, *CpG islands in vertebrate genomes*. J Mol Biol, 1987. **196**(2): p. 261-82.
46. Chow, J. and E. Heard, *X inactivation and the complexities of silencing a sex chromosome*. Curr Opin Cell Biol, 2009. **21**(3): p. 359-66.
47. Csankovszki, G., A. Nagy, and R. Jaenisch, *Synergism of Xist RNA, DNA methylation, and histone hypoacetylation in maintaining X chromosome inactivation*. J Cell Biol, 2001. **153**(4): p. 773-84.
48. Ideraabdullah, F.Y., S. Vigneau, and M.S. Bartolomei, *Genomic imprinting mechanisms in mammals*. Mutat Res, 2008. **647**(1-2): p. 77-85.
49. Monk, M., *Genomic imprinting*. Genes Dev, 1988. **2**(8): p. 921-5.
50. Yoder, J.A., C.P. Walsh, and T.H. Bestor, *Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites*. Trends Genet, 1997. **13**(8): p. 335-40.

51. Okano, M., et al., *DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development*. Cell, 1999. **99**(3): p. 247-57.
52. Jaenisch, R., et al., *DNA methylation, retroviruses, and embryogenesis*. J Cell Biochem, 1982. **20**(4): p. 331-6.
53. Pradhan, S., et al., *Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation*. J Biol Chem, 1999. **274**(46): p. 33002-10.
54. Holliday, R. and J.E. Pugh, *DNA modification mechanisms and gene activity during development*. Science, 1975. **187**(4173): p. 226-32.
55. Bestor, T.H., *Activation of mammalian DNA methyltransferase by cleavage of a Zn binding regulatory domain*. EMBO J, 1992. **11**(7): p. 2611-7.
56. Rhee, I., et al., *CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1*. Nature, 2000. **404**(6781): p. 1003-7.
57. Feinberg, A.P. and B. Tycko, *The history of cancer epigenetics*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(2): p. 143-53.
58. Esteller, M., *Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(4): p. 286-98.
59. Egger, G., et al., *Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy*. Nature, 2004. **429**(6990): p. 457-63.
60. Hu, S.L., et al., *Promoter methylation of p16, Runx3, DAPK and CHFR genes is frequent in gastric carcinoma*. Tumori, 2010. **96**(5): p. 726-33.
61. Matsuda, Y., et al., *p16(INK4) is inactivated by extensive CpG methylation in human hepatocellular carcinoma*. Gastroenterology, 1999. **116**(2): p. 394-400.
62. Sugawara, W., et al., *Promoter hypermethylation of the RASSF1A gene predicts the poor outcome of patients with hepatoblastoma*. Pediatr Blood Cancer, 2007. **49**(3): p. 240-9.
63. Fahrner, J.A., et al., *Dependence of histone modifications and gene expression on DNA hypermethylation in cancer*. Cancer Res, 2002. **62**(24): p. 7213-8.
64. Cui, H., et al., *Loss of IGF2 imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk*. Science, 2003. **299**(5613): p. 1753-5.
65. Wozney, J.M., et al., *Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities*. Science, 1988. **242**(4885): p. 1528-34.
66. Lyons, K.M., B.L. Hogan, and E.J. Robertson, *Colocalization of BMP 7 and BMP 2 RNAs suggests that these factors cooperatively mediate tissue interactions during murine development*. Mech Dev, 1995. **50**(1): p. 71-83.
67. Duprez, D.M., et al., *Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) inhibits muscle development and promotes cartilage formation in chick limb bud cultures*. Dev Biol, 1996. **174**(2): p. 448-52.
68. Vaahtokari, A., et al., *The enamel knot as a signaling center in the developing mouse tooth*. Mech Dev, 1996. **54**(1): p. 39-43.
69. Narita, T., et al., *BMPs are necessary for stomach gland formation in the chicken embryo: a study using virally induced BMP-2 and Noggin expression*. Development, 2000. **127**(5): p. 981-8.
70. Moustakas, A. and C.H. Heldin, *From mono- to oligo-Smads: the heart of the matter in TGF-beta signal transduction*. Genes Dev, 2002. **16**(15): p. 1867-71.
71. Chen, D., M. Zhao, and G.R. Mundy, *Bone morphogenetic proteins*. Growth Factors, 2004. **22**(4): p. 233-41.
72. Miyazono, K., *TGF-beta signaling by Smad proteins*. Cytokine Growth Factor Rev, 2000. **11**(1-2): p. 15-22.
73. von Bubnoff, A. and K.W. Cho, *Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network?* Dev Biol, 2001. **239**(1): p. 1-14.
74. Wrana, J.L., et al., *Mechanism of activation of the TGF-beta receptor*. Nature, 1994. **370**(6488): p. 341-7.
75. Massague, J. and Y.G. Chen, *Controlling TGF-beta signaling*. Genes Dev, 2000. **14**(6): p. 627-44.

76. Hollnagel, A., et al., *Id genes are direct targets of bone morphogenetic protein induction in embryonic stem cells*. J Biol Chem, 1999. **274**(28): p. 19838-45.
77. Du, Y. and H. Yip, *Effects of bone morphogenetic protein 2 on Id expression and neuroblastoma cell differentiation*. Differentiation, 2010. **79**(2): p. 84-92.
78. Cho, K.W. and I.L. Blitz, *BMPs, Smads and metalloproteases: extracellular and intracellular modes of negative regulation*. Curr Opin Genet Dev, 1998. **8**(4): p. 443-9.
79. Onichtchouk, D., et al., *Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI*. Nature, 1999. **401**(6752): p. 480-5.
80. Hoppler, S. and R.T. Moon, *BMP-2/-4 and Wnt-8 cooperatively pattern the Xenopus mesoderm*. Mech Dev, 1998. **71**(1-2): p. 119-29.
81. Hata, A., et al., *Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor*. Genes Dev, 1998. **12**(2): p. 186-97.
82. Kretzschmar, M., J. Doody, and J. Massague, *Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF-beta family mediator Smad1*. Nature, 1997. **389**(6651): p. 618-22.
83. Fong, Y.C., et al., *BMP-2 increases migration of human chondrosarcoma cells via PI3K/Akt pathway*. J Cell Physiol, 2008. **217**(3): p. 846-55.
84. Raida, M., et al., *Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) and induction of tumor angiogenesis*. J Cancer Res Clin Oncol, 2005. **131**(11): p. 741-50.
85. Kang, M.H., et al., *BMP2 accelerates the motility and invasiveness of gastric cancer cells via activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathway*. Exp Cell Res, 2010. **316**(1): p. 24-37.
86. Langenfeld, E.M., et al., *The mature bone morphogenetic protein-2 is aberrantly expressed in non-small cell lung carcinomas and stimulates tumor growth of A549 cells*. Carcinogenesis, 2003. **24**(9): p. 1445-54.
87. Soda, H., et al., *Antiproliferative effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on human tumor colony-forming units*. Anticancer Drugs, 1998. **9**(4): p. 327-31.
88. Horvath, L.G., et al., *Loss of BMP2, Smad8, and Smad4 expression in prostate cancer progression*. Prostate, 2004. **59**(3): p. 234-42.
89. Ide, H., et al., *Growth regulation of human prostate cancer cells by bone morphogenetic protein-2*. Cancer Res, 1997. **57**(22): p. 5022-7.
90. Johnsen, I.K., et al., *Bone morphogenetic proteins 2 and 5 are down-regulated in adrenocortical carcinoma and modulate adrenal cell proliferation and steroidogenesis*. Cancer Res, 2009. **69**(14): p. 5784-92.
91. Ghosh-Choudhury, N., et al., *Bone morphogenetic protein-2 blocks MDA MB 231 human breast cancer cell proliferation by inhibiting cyclin-dependent kinase-mediated retinoblastoma protein phosphorylation*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **272**(3): p. 705-11.
92. Kawamura, C., M. Kizaki, and Y. Ikeda, *Bone morphogenetic protein (BMP)-2 induces apoptosis in human myeloma cells*. Leuk Lymphoma, 2002. **43**(3): p. 635-9.
93. Zhao, H., et al., *Post-transcriptional down-regulation of Atoh1/Math1 by bone morphogenic proteins suppresses medulloblastoma development*. Genes Dev, 2008. **22**(6): p. 722-7.
94. Howe, J.R., et al., *Germline mutations of the gene encoding bone morphogenetic protein receptor 1A in juvenile polyposis*. Nat Genet, 2001. **28**(2): p. 184-7.
95. Kodach, L.L., et al., *The bone morphogenetic protein pathway is inactivated in the majority of sporadic colorectal cancers*. Gastroenterology, 2008. **134**(5): p. 1332-41.
96. Beck, S.E., et al., *Bone morphogenetic protein signaling and growth suppression in colon cancer*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. **291**(1): p. G135-45.
97. Wen, X.Z., et al., *Frequent epigenetic silencing of the bone morphogenetic protein 2 gene through methylation in gastric carcinomas*. Oncogene, 2006. **25**(18): p. 2666-73.
98. Clark, S.J., et al., *High sensitivity mapping of methylated cytosines*. Nucleic Acids Res, 1994. **22**(15): p. 2990-7.

99. Bird, A.P., *CpG-rich islands and the function of DNA methylation*. Nature, 1986. **321**(6067): p. 209-13.
100. Cihak, A., *Biological effects of 5-azacytidine in eukaryotes*. Oncology, 1974. **30**(5): p. 405-22.
101. Jones, P.A. and S.M. Taylor, *Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation*. Cell, 1980. **20**(1): p. 85-93.
102. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.
103. Gebhard, C., et al., *General transcription factor binding at CpG islands in normal cells correlates with resistance to de novo DNA methylation in cancer cells*. Cancer Res, 2010. **70**(4): p. 1398-407.
104. Hahn, H., et al., *Patched target Igf2 is indispensable for the formation of medulloblastoma and rhabdomyosarcoma*. J Biol Chem, 2000. **275**(37): p. 28341-4.
105. Jogie-Brahim, S., D. Feldman, and Y. Oh, *Unraveling insulin-like growth factor binding protein-3 actions in human disease*. Endocr Rev, 2009. **30**(5): p. 417-37.
106. Wen, X.Z., et al., *BMP-2 modulates the proliferation and differentiation of normal and cancerous gastric cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **316**(1): p. 100-6.
107. Wong, G.A., et al., *BMP-2 inhibits proliferation of human aortic smooth muscle cells via p21Cip1/Waf1*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. **284**(5): p. E972-9.
108. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell, 1990. **61**(5): p. 759-67.
109. Weinberg, R.A., *Tumor suppressor genes*. Science, 1991. **254**(5035): p. 1138-46.
110. Merlo, A., et al., *5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers*. Nat Med, 1995. **1**(7): p. 686-92.
111. Esteller, M., et al., *Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(7): p. 564-9.
112. Dobrovic, A. and D. Simpfendorfer, *Methylation of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer*. Cancer Res, 1997. **57**(16): p. 3347-50.
113. Kane, M.F., et al., *Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines*. Cancer Res, 1997. **57**(5): p. 808-11.
114. Fleisher, A.S., et al., *Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in human gastric cancers with microsatellite instability*. Cancer Res, 1999. **59**(5): p. 1090-5.
115. Kurmasheva, R.T., et al., *Upstream CpG island methylation of the PAX3 gene in human rhabdomyosarcomas*. Pediatr Blood Cancer, 2005. **44**(4): p. 328-37.
116. Chen, B., et al., *Inhibition of the interferon-gamma/signal transducers and activators of transcription (STAT) pathway by hypermethylation at a STAT-binding site in the p21WAF1 promoter region*. Cancer Res, 2000. **60**(12): p. 3290-8.
117. Burbee, D.G., et al., *Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression*. J Natl Cancer Inst, 2001. **93**(9): p. 691-9.
118. Dammann, R., et al., *Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3*. Nat Genet, 2000. **25**(3): p. 315-9.
119. Morrissey, C., et al., *Epigenetic inactivation of the RASSF1A 3p21.3 tumor suppressor gene in both clear cell and papillary renal cell carcinoma*. Cancer Res, 2001. **61**(19): p. 7277-81.
120. Yoon, J.H., R. Dammann, and G.P. Pfeifer, *Hypermethylation of the CpG island of the RASSF1A gene in ovarian and renal cell carcinomas*. Int J Cancer, 2001. **94**(2): p. 212-7.
121. Dammann, R., G. Yang, and G.P. Pfeifer, *Hypermethylation of the cpG island of Ras association domain family 1A (RASSF1A), a putative tumor suppressor gene from the 3p21.3 locus, occurs in a large percentage of human breast cancers*. Cancer Res, 2001. **61**(7): p. 3105-9.

122. Issa, J.P., *Epigenetic variation and human disease*. J Nutr, 2002. **132**(8 Suppl): p. 2388S-2392S.
123. Patra, S.K. and S. Bettuzzi, *Epigenetic DNA-(cytosine-5-carbon) modifications: 5-aza-2'-deoxycytidine and DNA-demethylation*. Biochemistry (Mosc), 2009. **74**(6): p. 613-9.
124. Cretnik, M., et al., *The Patched gene is epigenetically regulated in ovarian dermoids and fibromas, but not in basocellular carcinomas*. Int J Mol Med, 2007. **19**(6): p. 875-83.
125. Tada, M., et al., *Down-regulation of hedgehog-interacting protein through genetic and epigenetic alterations in human hepatocellular carcinoma*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(12): p. 3768-76.
126. Frank, M.J., et al., *Expression of sprouty2 inhibits B-cell proliferation and is epigenetically silenced in mouse and human B-cell lymphomas*. Blood, 2009. **113**(11): p. 2478-87.
127. Suryawan, A., et al., *Expression of the TGF-beta family of ligands is developmentally regulated in skeletal muscle of neonatal rats*. Pediatr Res, 2006. **59**(2): p. 175-9.
128. Inada, M., et al., *Bone morphogenetic protein-12 and -13 inhibit terminal differentiation of myoblasts, but do not induce their differentiation into osteoblasts*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **222**(2): p. 317-22.
129. Nakaoka, T., et al., *Inhibition of rat vascular smooth muscle proliferation in vitro and in vivo by bone morphogenetic protein-2*. J Clin Invest, 1997. **100**(11): p. 2824-32.
130. Lee, S.J. and A.C. McPherron, *Regulation of myostatin activity and muscle growth*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(16): p. 9306-11.
131. Amthor, H., et al., *Follistatin complexes Myostatin and antagonises Myostatin-mediated inhibition of myogenesis*. Dev Biol, 2004. **270**(1): p. 19-30.
132. Sheikhnjad, G., et al., *Mechanism of inhibition of DNA (cytosine C5)-methyltransferases by oligodeoxyribonucleotides containing 5,6-dihydro-5-azacytosine*. J Mol Biol, 1999. **285**(5): p. 2021-34.
133. Jabbour, E., et al., *Evolution of decitabine development: accomplishments, ongoing investigations, and future strategies*. Cancer, 2008. **112**(11): p. 2341-51.
134. Cameron, E.E., et al., *Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer*. Nat Genet, 1999. **21**(1): p. 103-7.
135. Mossman, D., K.T. Kim, and R.J. Scott, *Demethylation by 5-aza-2'-deoxycytidine in colorectal cancer cells targets genomic DNA whilst promoter CpG island methylation persists*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 366.
136. Tachibana, K., Takeda, K., Shiraishi, M., *5-Aza-2'-deoxycytidine reactivates the CDH1 gene without influencing the methylation of the entire CpG island or histone modification in a human cancer cell line*. Proc Japan Acad, 2004. **80**(7): p. 342-348.
137. Pregizer, S. and D.P. Mortlock, *Control of BMP gene expression by long-range regulatory elements*. Cytokine Growth Factor Rev, 2009. **20**(5-6): p. 509-15.
138. Chandler, R.L., et al., *Bmp2 transcription in osteoblast progenitors is regulated by a distant 3' enhancer located 156.3 kilobases from the promoter*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(8): p. 2934-51.
139. Shimizu, R., J.D. Engel, and M. Yamamoto, *GATA1-related leukaemias*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(4): p. 279-87.
140. Rylski, M., et al., *GATA-1-mediated proliferation arrest during erythroid maturation*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(14): p. 5031-42.
141. Ghosh-Choudhury, N., et al., *Autoregulation of mouse BMP-2 gene transcription is directed by the proximal promoter element*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **286**(1): p. 101-8.
142. Kawamura, C., et al., *Bone morphogenetic protein-2 induces apoptosis in human myeloma cells with modulation of STAT3*. Blood, 2000. **96**(6): p. 2005-11.
143. Song, Q., M.F. Mehler, and J.A. Kessler, *Bone morphogenetic proteins induce apoptosis and growth factor dependence of cultured sympathoadrenal progenitor cells*. Dev Biol, 1998. **196**(1): p. 119-27.

144. Zhang, S., et al., *Bone morphogenetic proteins induce apoptosis in human pulmonary vascular smooth muscle cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003. **285**(3): p. L740-54.
145. Clement, J.H., et al., *Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) induces sequential changes of Id gene expression in the breast cancer cell line MCF-7*. J Cancer Res Clin Oncol, 2000. **126**(5): p. 271-9.
146. Norton, J.D. and G.T. Atherton, *Coupling of cell growth control and apoptosis functions of Id proteins*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(4): p. 2371-81.
147. Iantosca, M.R., et al., *Bone morphogenetic proteins-2 and -4 attenuate apoptosis in a cerebellar primitive neuroectodermal tumor cell line*. J Neurosci Res, 1999. **56**(3): p. 248-58.
148. Melino, G., R.A. Knight, and P. Nicotera, *How many ways to die? How many different models of cell death?* Cell Death Differ, 2005. **12 Suppl 2**: p. 1457-62.
149. Tait, S.W. and D.R. Green, *Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut*. Oncogene, 2008. **27**(50): p. 6452-61.
150. Ekert, P.G., et al., *Apaf-1 and caspase-9 accelerate apoptosis, but do not determine whether factor-deprived or drug-treated cells die*. J Cell Biol, 2004. **165**(6): p. 835-42.
151. Taylor, R.C., S.P. Cullen, and S.J. Martin, *Apoptosis: controlled demolition at the cellular level*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(3): p. 231-41.
152. Deveraux, Q.L., et al., *X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases*. Nature, 1997. **388**(6639): p. 300-4.
153. Sasaki, H., et al., *Down-regulation of X-linked inhibitor of apoptosis protein induces apoptosis in chemoresistant human ovarian cancer cells*. Cancer Res, 2000. **60**(20): p. 5659-66.
154. Tamm, I., et al., *Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(5): p. 1796-803.
155. Carter, B.Z., et al., *Caspase-independent cell death in AML: caspase inhibition in vitro with pan-caspase inhibitors or in vivo by XIAP or Survivin does not affect cell survival or prognosis*. Blood, 2003. **102**(12): p. 4179-86.
156. Yamaguchi, K., et al., *XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway*. EMBO J, 1999. **18**(1): p. 179-87.
157. Ogata, T., et al., *Bone morphogenetic protein 2 transiently enhances expression of a gene, Id (inhibitor of differentiation), encoding a helix-loop-helix molecule in osteoblast-like cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(19): p. 9219-22.
158. Katagiri, T., et al., *Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage*. J Cell Biol, 1994. **127**(6 Pt 1): p. 1755-66.
159. Norton, J.D., et al., *Id helix-loop-helix proteins in cell growth and differentiation*. Trends Cell Biol, 1998. **8**(2): p. 58-65.
160. Zhan, S., D.N. Shapiro, and L.J. Helman, *Activation of an imprinted allele of the insulin-like growth factor II gene implicated in rhabdomyosarcoma*. J Clin Invest, 1994. **94**(1): p. 445-8.
161. Anderson, J., et al., *Genes, chromosomes, and rhabdomyosarcoma*. Genes Chromosomes Cancer, 1999. **26**(4): p. 275-85.
162. Wang, W., et al., *Insulin-like growth factor II and PAX3-FKHR cooperate in the oncogenesis of rhabdomyosarcoma*. Cancer Res, 1998. **58**(19): p. 4426-33.
163. Kalebic, T., M. Tsokos, and L.J. Helman, *In vivo treatment with antibody against IGF-1 receptor suppresses growth of human rhabdomyosarcoma and down-regulates p34cdc2*. Cancer Res, 1994. **54**(21): p. 5531-4.
164. Shapiro, D.N., et al., *Antisense-mediated reduction in insulin-like growth factor-I receptor expression suppresses the malignant phenotype of a human alveolar rhabdomyosarcoma*. J Clin Invest, 1994. **94**(3): p. 1235-42.

165. Minniti, C.P., M. Maggi, and L.J. Helman, *Suramin inhibits the growth of human rhabdomyosarcoma by interrupting the insulin-like growth factor II autocrine growth loop*. *Cancer Res*, 1992. **52**(7): p. 1830-5.
166. Rajaram, S., D.J. Baylink, and S. Mohan, *Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions*. *Endocr Rev*, 1997. **18**(6): p. 801-31.
167. Sherr, C.J. and J.M. Roberts, *CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression*. *Genes Dev*, 1999. **13**(12): p. 1501-12.
168. Wozney, J.M. and V. Rosen, *Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair*. *Clin Orthop Relat Res*, 1998(346): p. 26-37.
169. Seeherman, H., J. Wozney, and R. Li, *Bone morphogenetic protein delivery systems*. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2002. **27**(16 Suppl 1): p. S16-23.
170. Gautschi, O.P., S.P. Frey, and R. Zellweger, *Bone morphogenetic proteins in clinical applications*. *ANZ J Surg*, 2007. **77**(8): p. 626-31.
171. McKay, W.F., S.M. Peckham, and J.M. Badura, *A comprehensive clinical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (INFUSE Bone Graft)*. *Int Orthop*, 2007. **31**(6): p. 729-34.
172. Lieberman, J.R., et al., *Regional gene therapy with a BMP-2-producing murine stromal cell line induces heterotopic and orthotopic bone formation in rodents*. *J Orthop Res*, 1998. **16**(3): p. 330-9.
173. Alden, T.D., et al., *Bone morphogenetic protein gene therapy*. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2002. **27**(16 Suppl 1): p. S87-93.
174. Alden, T.D., et al., *In vivo endochondral bone formation using a bone morphogenetic protein 2 adenoviral vector*. *Hum Gene Ther*, 1999. **10**(13): p. 2245-53.
175. Lee, J.Y., et al., *Enhancement of bone healing based on ex vivo gene therapy using human muscle-derived cells expressing bone morphogenetic protein 2*. *Hum Gene Ther*, 2002. **13**(10): p. 1201-11.
176. Niyibizi, C., et al., *Potential role for gene therapy in the enhancement of fracture healing*. *Clin Orthop Relat Res*, 1998(355 Suppl): p. S148-53.
177. Li, X., H.Y. Yang, and C.M. Giachelli, *BMP-2 promotes phosphate uptake, phenotypic modulation, and calcification of human vascular smooth muscle cells*. *Atherosclerosis*, 2008. **199**(2): p. 271-7.
178. Ingham, P.W. and A.P. McMahon, *Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles*. *Genes Dev*, 2001. **15**(23): p. 3059-87.
179. Ruiz i Altaba, A., P. Sanchez, and N. Dahmane, *Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(5): p. 361-72.
180. Oue, T., et al., *Increased expression of the hedgehog signaling pathway in pediatric solid malignancies*. *J Pediatr Surg*, 2010. **45**(2): p. 387-92.
181. Toftgard, R., *Hedgehog signalling in cancer*. *Cell Mol Life Sci*, 2000. **57**(12): p. 1720-31.
182. Tostar, U., et al., *Deregulation of the hedgehog signalling pathway: a possible role for the PTCH and SUFU genes in human rhabdomyoma and rhabdomyosarcoma development*. *J Pathol*, 2006. **208**(1): p. 17-25.
183. Zibat, A., et al., *Activation of the hedgehog pathway confers a poor prognosis in embryonal and fusion gene-negative alveolar rhabdomyosarcoma*. *Oncogene*, 2010. **29**(48): p. 6323-30.
184. Goodrich, L.V., et al., *Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants*. *Science*, 1997. **277**(5329): p. 1109-13.
185. Hahn, H., et al., *Rhabdomyosarcomas and radiation hypersensitivity in a mouse model of Gorlin syndrome*. *Nat Med*, 1998. **4**(5): p. 619-22.
186. Gorlin, R.J., *Nevoid basal-cell carcinoma syndrome*. *Medicine (Baltimore)*, 1987. **66**(2): p. 98-113.

187. Beddis, I.R., M.G. Mott, and J. Bullimore, *Case report: nasopharyngeal rhabdomyosarcoma and Gorlin's naevoid basal cell carcinoma syndrome*. Med Pediatr Oncol, 1983. **11**(3): p. 178-9.
188. Marino, S., *Medulloblastoma: developmental mechanisms out of control*. Trends Mol Med, 2005. **11**(1): p. 17-22.
189. Tremblay, M.R., et al., *Recent patents for Hedgehog pathway inhibitors for the treatment of malignancy*. Expert Opin Ther Pat, 2009. **19**(8): p. 1039-56.
190. Heretsch, P., L. Tzagkaroulaki, and A. Giannis, *Modulators of the hedgehog signaling pathway*. Bioorg Med Chem, 2010. **18**(18): p. 6613-24.
191. Ecke, I., et al., *Cyclopamine treatment of full-blown Hh/Ptch-associated RMS partially inhibits Hh/Ptch signaling, but not tumor growth*. Mol Carcinog, 2008. **47**(5): p. 361-72.
192. Eichenmuller, M., et al., *Betulinic acid induces apoptosis and inhibits hedgehog signalling in rhabdomyosarcoma*. Br J Cancer, 2010. **103**(1): p. 43-51.

9 Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ARMS	alveoläres Rhabdomyosarkom
ATOH1	atonal homolog 1
Aza	5-Aza-2'-deoxycytidin
BAMBI	<i>BMP and activin membrane bound inhibitor</i>
BAX	<i>BCL2-associated X protein</i>
BCL2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
BMP2	<i>bone morphogenetic protein 2</i>
BMPR1A, 1B, 2	<i>bone morphogenetic protein receptor, type 1A, 1B, 1I</i>
BRCA1	<i>breast cancer 1</i>
BSA	Bovine Serum Albumine
BTG2	<i>BTG family, member 2</i>
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
CDH1	<i>cadherin 1</i>
cDNA	complementary DNA
CDK6	<i>cyclin-dependent kinase 6</i>
CDKN1A, 2A, 2B	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, 2A, 2B</i>
CICD	Caspase-unabhängige Apoptose
cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
CpG	Cytosin-Guanin-Dinukleotid
d	Tag
DNA	desoxyribonucleic acid
DNMT	DNA-Methyltransferase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EcoRI	Nuklease I aus dem Stamm R von <i>E.coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetracyanat
ERMS	embryonales Rhabdomyosarkom
et al.	und andere
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis coli
FBS	Fetale Bovine Serum
FCS	Fetale Calf Serum
FKHR = FOXO1	<i>forkhead box protein O1</i>
FOXA2	<i>forkhead box A2</i>
Fw	forward
GATA-1	GATA-binding factor 1/Erythroid transcription factor
GFP	Green Fluorescence Protein
GLI	<i>glioma-associated oncogene homolog</i>
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HHIP	<i>human hedgehog interacting protein</i>
HindIII	Restriktionsendonuklease aus Haemophilus influenzae
HIPK2	<i>homeodomain interacting protein kinase 2</i>
ID1-3	<i>inhibitor of DNA binding proteins 1-3</i>
IGF2	<i>insulin like growth factor 2</i>
IGFBP3	<i>insulin-like growth factor binding protein 3</i>
IGF1R	<i>insulin-like growth factor 1 receptor</i>

JAK	Janus kinase
kb	Kilo-Basenpaar
LB	Lysogeny Broth
M	Molar
M/U	Methyliert/Unmethyliert
MAPK/ERK	Mitogen-activated protein kinase
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter (10 ⁻³)
MLH1	<i>mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2</i>
mm	Millimeter (10 ⁻³)
mM	Millimolar (10 ⁻³)
mm ³	Kubikmillimeter
mRNA	messenger RNA
MSP	Methylierungsspezifische Polymerasekettenreaktion
M.SssI	CpG-Methyltransferase
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MYC	<i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm (10 ⁻⁹)
nm	Nanometer (10 ⁻⁹)
NTPs (ATP, CTP, GTP, UTP)	Nukleotid-TriPhosphat (Adenin-, Cytosin-, Guanin-, Uracil-)
p16 = CDKN2A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2a</i>
p18 = CDKN2C	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2c</i>
p21 = CDKN1A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1a</i>
p27 = CDKN1B	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1b</i>
PAX3	<i>paired box 3</i>
PAX7	<i>paired box 7</i>
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PenStrep	Penicillin + Streptomycin
PTCH1	<i>patched1</i>
Q-PCR/RT-PCR	quantitative real-time PCR
RASSF1A	<i>ras association domain-containing protein 1A</i>
Rev	reverse
rhBMP2	rekombinates humanes BMP2
RMS	Rhabdomyosarkom
RNA	Ribonukleinsäure
RNase H	Ribonuklease H
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
SAM	S-adenosylmethionine
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sek	Sekunden
SHH	<i>sonic hedgehog</i>
SM	Skelettmuskel
Sma I	Nuklease I aus <i>Serratia marcescens</i>
Smad	Mothers against decapentaplegic homolog
Smurf1	Smad ubiquitination regulatory factor 1
SPRY2	<i>sprouty homolog 2</i>
STAT	Signal transducer and activator of transcription
STE	Sodium Chlorid-Tris-EDTA

TAK1	TGF-beta activated kinase 1
Taq-Polymerase	DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>
TBP	<i>TATA-box-binding protein</i> (Haushaltsgen)
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TGF- β	Transforming growth factor beta
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TWIST1	<i>twist homolog 1</i>
U	Einheit
μg	Mikrogramm (10^{-6})
μl	Mikroliter (10^{-6})
μM	Mikromolar (10^{-6})
UV	ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
WNT	sekretierter Ligand von frz und frzB, Protein der Wnt-Signalkaskade
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein

10 Wissenschaftliche Beiträge

10.1 Tagungsbeiträge

- Vortrag im Rahmen der Abschlusstagung des Promotionsstudienganges Förderung für Forschung und Lehre der Ludwig-Maximilians-Universität München, Herrsching, Juni 2010
- Vortrag im Rahmen der XIII. Jahrestagung der Kind-Phillip-Stiftung für Leukämieforschung, Wilsede, Lüneburger Heide, Juli 2010, Wolf S., Hagl B., Leuschner I., von Schweinitz D., Kappler R.

Reactivation of the epigenetically silenced BMP2 gene leads to reduced growth properties of rhabdomyosarcoma cells

- Posterpräsentation „Identifizierung epigenetisch regulierter Gene beim Rhabdomyosarkom“ auf der Doktorarbeitsmesse DoktaMed der Ludwig-Maximilians-Universität München, Mai 2011, Posterpreis

10.2 Publikationen

- Manuskript „in Vorbereitung“

11 Danksagung

Abschließend will ich mich bei allen Personen bedanken, die dazu beigetragen haben, dass ich meine Doktorarbeit erfolgreich durchführen konnte.

Hierbei gilt mein Dank zunächst Herrn Prof. Dr. Dietrich von Schweinitz, Direktor der Kinderchirurgischen Klinik im Dr. von Hauner'schen Kinderspitals der Ludwig-Maximilians-Universität München, einerseits wegen der Überlassung des Themas und andererseits der Möglichkeit meine Doktorarbeit in den kinderchirurgischen Forschungslaboratorien durchzuführen.

Besonders danken möchte ich allen voran meinem Doktorvater Prof. Dr. Roland Kappler. Hervorzuheben sind hier vor allem die ausgezeichnete Betreuung, die interessanten und lehrreichen Diskussionen sowie die sehr kompetente fachliche Unterstützung. Die Bedingungen zur Durchführung meiner Doktorarbeit hätten nicht besser sein können.

Speziell danken möchte ich auch meiner Betreuerin Frau Dr. Beate Hagl, die mir jederzeit mit ihrem sehr hilfreichen Rat zur Seite stand, auch die hundertste Frage von mir mit großer Geduld und Kompetenz beantwortete und so zu einem großen Maße zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen hat.

Desweiteren möchte ich den technischen Assistentinnen Shiva Promoli, Anett Domokos und Nicole Stadler für ihre wertvolle Unterstützung danken, sowie Johanna Helmbrecht und Saskia Joppien, die mir durch ihre Erfahrung und ihr Wissen eine große Hilfe bei der Durchführung verschiedener Experimente waren.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Beuschlein für die Bereitstellung wichtiger Komponenten für einige meiner Versuche.

Meinen Eltern danke ich von ganzem Herzen dafür, dass sie immer für mich da waren und mich in jeglicher Situation unterstützt haben.